



TESIS DE DOCTORADO

MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE ENFERMEDADES CON BASE INFLAMATORIA CON COMPUESTOS DE ORIGEN MARINO

Sandra Gegunde Mosquera

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL DA UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN INVESTIGACIÓN BÁSICA Y APLICADA A
CIENCIAS VETERINARIAS

LUGO

ANO 2021



DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Modulación farmacológica de enfermedades con base inflamatoria con compuestos de origen marino

D^a. Sandra Gegunde Mosquera

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Lugo, 21 de julio de 2021

Firmado: Sandra Gegunde Mosquera.





AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Modulación farmacológica con compuestos de origen marino de enfermedades con base inflamatoria en modelos *in vivo* e *in vitro*

D. Luis M. Botana López

D^a. Amparo Alfonso Rancaño

INFORMAN:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D^a. Sandra Gegunde Mosquera, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con el artículo 41 del Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de COMPENDIO DE PUBLICACIONES, en los que la participación del doctorando/a fue decisiva para su elaboración.

La utilización de estos artículos en esta memoria, está en conocimiento de los coautores, tanto doctores como no doctores. Además, estos últimos tienen conocimiento de que ninguno de los trabajos aquí reunidos podrá ser presentado en ninguna otra tesis doctoral.

En Lugo, 20 de julio de 2021

Firmado. Luis M. Botana
López

Firmado. Amparo Alfonso
Rancaño



AGRADECIMIENTOS

A Luís, por haberme dado la oportunidad de realizar la Tesis en su grupo.

A Amparo, por haberme abierto las puertas de la investigación, por todo lo que me ha enseñado a lo largo de estos años, por su ayuda y confianza depositada y sobre todo por estar siempre ahí y por su paciencia conmigo.

A todos mis compañeros, a los que estaban cuándo llegué y tan bien me han acogido, Jesús, Eva, Rebeca, Andrea, Paula e Inés. A los que han llegado más tarde, Nadia, Lara, Celia y Sandra. Por los cafés, los congresos, las cenas y los momentos día a día que hemos compartido. En especial a Rebeca y Eva, por todo lo que me han enseñado en estos cuatro años, por su ayuda y por su paciencia.

A mis amigos, por estar incondicionalmente siempre ahí, a los de Santiago, a los de Monforte, a “Friends hacendado” y a los que he ido ganando desde que llegué a Lugo hace casi diez años, especialmente a Mathilde, con la que he ido codo a codo desde el primer mes de carrera.

Por último, pero no menos importante, a mi madre, a mi padre y a mis abuelos, Loly y Alfonso. Por apoyarme y por creer siempre en mí, por hacer que nunca tirase la toalla y siguiese siempre hacia adelante.

A la Fundación de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (FIDIS) por la concesión de la beca “Becas predoutorais FIDIS”, que ha permitido la realización de esta Tesis, y también a todas las personas que de alguna manera u otra han contribuido en la realización de la misma.



ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AMPK: quinasa activada por AMP, del inglés, *AMP-activated Protein Kinase*

AP-1: activador de proteína 1, del inglés, *activated protein 1*

APCs: células presentadoras de antígenos, del inglés, *Antigen Presenting Cells*

ARE: elemento de respuesta antioxidante, del inglés, *antioxidant response element*

BDNF: el factor neurotrófico derivado del cerebro, del inglés, *Brain-Derived Neurotrophic*

Factor

CD: antígeno de diferenciación, del inglés, *Cluster of Differentiation*

CEs: células endoteliales

CLD: dominio parecido a la Cyp, del inglés, *Cyclophilin-Like Domain*

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

COX-2: ciclooxigenasa-2

CsA: ciclosporina A

Cul3: complejo ligasa E3 basado en Cullin 3

Cyp: ciclofilina

DCFH-DA: 7',2'-dichlorofluorescein diacetato

EAC: enfermedad de las arterias coronarias

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, del inglés, *Enzyme-Linked*

ImmunoSorbent Assay

ERK1/2: quinasas 1 y 2 reguladas por señales extracelulares, del inglés, *Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2*

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos, del inglés, *Food and Drug Administration*

FKBP: proteínas de unión a FK506, del inglés *FK506-Binding Proteins*

GABS: proteína adaptadora relacionada con GRB2, del inglés, *GRB2-related Adaptor downstream of Shc*

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, del inglés, *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*

GRB2: proteína 2 unida a factores de crecimiento, del inglés, *Growth factor Receptor-Bound protein 2*

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1, del inglés *Intercellular Adhesion Molecule-1*

IFN: interferón

IKK: I κ B quinasa, del inglés, *I κ B kinase*

IL: interleucina

iNOS: la enzima inducible de óxido nítrico sintasa, del inglés, *inducible Nitric Oxide Synthase*

ITAM: del inglés, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*

JNK/SAPK: quinasa c-Jun N-terminal/proteína cinasa activada por estrés, del inglés, *c-Jun N-Terminal kinase/Stress Activated protein kinases*

JNK: quinasas c-Jun N-terminal, del inglés, *c-Jun N-terminal Kinase*

Keap1: proteína 1 asociada a ECH parecida a Kelch, del inglés, *Kelch-like ECH-associated protein 1*

LAT: estabilizador de células T activadas, del inglés, *Linker of Activated T-cells*

LCK: proteína tirosina quinasa específicas de linfocitos T

LDL: lipoproteína de baja densidad, del inglés, *Low Density Lipoprotein*

LPS: lipopolisacárido

MAPK: proteínas quinasa activadas por mitógenos, del inglés, *Mitogen Activated Protein*

Kinases

MCP-1: molécula quimioatrayente de monocitos 1, del inglés, *Monocyte Chemoattractant protein-1*

MMPs: metaloproteinasas de matriz, del inglés, *Matrix MetalloProteinases*

mPTP: poro de transición de permeabilidad mitocondrial

mTOR: diana de la rapamicina en células de mamíferos, del inglés *mammalian target of rapamycin*

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NFAT: factor nuclear de células T activadas, del inglés, *Nuclear Factor of Activated T cells*

NF- κ B: factor nuclear κ B, del inglés, *Nuclear Factor κ B*

NGF: factor de crecimiento nervioso, del inglés, *Nerve Growth Factor*

NIK: quinasa inductora de NF- κ B, del inglés, *NF- κ B-Inducing Kinase*

NO: óxido nítrico, del inglés, *Nitric Oxide*

NOS: la enzima de óxido nítrico sintasa, del inglés, *Nitric Oxide Synthase*

NOX: NADPH oxidasa

Nrf2: factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2, del inglés, *Nuclear factor erythroid-2-Related Factor 2*

OxLDL: LDL oxidada

PAMPS: patrones moleculares asociados a patógenos, del inglés, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

PBS: solución salina tamponada con fosfato, del inglés *phosphate buffered saline*

pCMH: péptidos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad

PPIasa: Peptidil-prolil-*cis/trans*-isomerasas

PRR: receptores de reconocimiento de patrón, del inglés, *Pattern-Recognition Receptors*

RANTES: del inglés, *Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Excreted*

RE: retículo endoplasmático

RNS: especies reactivas de nitrógeno, del inglés, *Reactive Nitrogen Species*

ROS: especies reactivas de oxígeno, del inglés, *Reactive Oxygen Species*

TCR: receptor de linfocitos T, del inglés, *T-Cell Receptor*

TGF β : factor de crecimiento transformante β , del inglés, *Transforming Growth Factor β*

TLR: receptores tipo Toll, del inglés, *Toll-like receptor*

TMRM: Tetrametilrodamina metil éster

TNF: factor de necrosis tumoral, del inglés, *Tumor Necrosis Factor*

TNFR: receptor de TNF, del inglés, *TNF Receptor*

VCAM-1: molécula de adhesión vascular 1, del inglés *Vascular Cell Adhesion Molecule-*

1

VSMCs: células del músculo liso vascular, del inglés, *Vascular Smooth Muscle Cells*

ÍNDICE

Resumen	1
1. Introducción	5
1.1. LA RESPUESTA INFLAMATORIA	5
1.2. CICLOFILINAS	27
1.3. COMPUESTOS DE ORIGEN MARINO CON ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA.....	37
2. Objetivos	49
3. Material y métodos	51
4. Publicaciones	61
1. Zoanthamine Alkaloids from the Zoantharian Zoanthus cf. pulchellus and Their Effects in Neuroinflammation	63
2. Treasures from the deep: Characellides as anti-Inflammatory lipoglycotriptides from the Sponge <i>Characella pachastrelloides</i>	65
3. Bromotryptamine and bromotyramine derivatives from the tropical southwestern pacific sponge <i>Narrabeena nigra</i>	67
4. Futunamine, a pyrrole-imidazole alkaloid from the sponge <i>Stylissa</i> aff. <i>carteri</i> collected off the Futuna Islands.....	69
5. Anhydroexfoliamycin, a <i>Streptomyces</i> -secondary metabolite, mitigates microglia-driven inflammation	71
6. Gracilin-derivatives as lead compounds for anti-inflammatory effects	73
7. Cyclophilins A, B and C role in human T lymphocytes upon inflammatory conditions.....	75
8. Crosstalk between cyclophilins and T lymphocytes in coronary artery disease	77
5. Discusión	79
6. ConclusionEs	93
7. Referencias	95





RESUMEN

En la Tesis Doctoral titulada “Modulación farmacológica de enfermedades con base inflamatoria con compuestos de origen marino” se describe el papel de las ciclofilinas A, B y C, así como el receptor de membrana CD147 en células del sistema inmune y en enfermedades relacionadas con la inflamación. Además, se detalla el potencial antiinflamatorio, en modelos celulares de inflamación, de compuestos naturales aislados de las esponjas *Characella pachastrelloides*, *Narrabeena nigra* y *Stylissa* aff. *carteri* y del coral *Zoanthus* cf. *pulchellus*, y se profundiza en las rutas que modulan la anhidroexfoliamicina un compuesto obtenido de *Streptomyces* sp., la gracilina L aislada de la esponja *Spongionella gracilis* y dos análogos sintéticos. En este sentido, la inflamación y sobre todo la inflamación crónica son un componente común de muchas enfermedades. En las últimas décadas se ha relacionado la inflamación con la patología de varios desordenes crónicos, como el cáncer, la diabetes, la artritis reumatoide, las enfermedades neurodegenerativas y algunas enfermedades cardiovasculares. Además, las ciclofilinas y en especial la ciclofilina A, son proteínas que participan en el proceso inflamatorio, pero su papel en estas patologías todavía no está bien definido. El único fármaco modulador de las ciclofilinas es el inmunosupresor ciclosporina A, con importantes efectos secundarios. Por lo tanto, es necesario determinar la función de las ciclofilinas y su relación con otros componentes de la respuesta inflamatoria. Además, desde el punto de vista farmacológico tiene un gran interés la identificación de nuevos compuestos con actividad antiinflamatoria que puedan servir como moléculas guía.

Para el estudio de los efectos de los compuestos de origen marino se usan como modelos celulares de inflamación y neuroinflamación líneas celulares de neuroblastoma y microglía y cultivos primarios de linfocitos T humanos purificados de sangre de donantes. De los 32 compuestos naturales estudiados, 19 muestran una gran actividad antiinflamatoria y tienen un potencial efecto neuroprotector. La anhidroexfoliamicina reduce la producción de especies reactivas de oxígenos, la liberación de mediadores inflamatorios y la expresión de enzimas inflamatorias. Además, modula la traslocación del citosol al núcleo de factores de transcripción implicados en el proceso inflamatorio. Este compuesto cambia el fenotipo de la microglía activada M1 a su estado M2 inhibiendo la respuesta inflamatoria, con efecto neuroprotector.

Para determinar el papel de las ciclofilinas en la inflamación, se estudian sus niveles en linfocitos T humanos. Se observa que, en condiciones de inflamación, la liberación al medio extracelular y la expresión intracelular de ciclofilinas A, B y C está significativamente aumentada. Además, se incrementa la expresión del receptor de membrana CD147. Estos incrementos se inhiben en presencia de gracilina L y de los dos análogos sintéticos (moduladores selectivos de la ciclofilina A). Estos compuestos impiden la migración de las células T en presencia de agentes quimiotácticos. La actividad antiinflamatoria de estos compuestos también se observa en células de la microglía, por un efecto mediado por la ruta de

la ciclofilina A. En el suero de pacientes con enfermedad de las arterias coronarias, modelo de enfermedad con base inflamatoria, los niveles de ciclofilinas A y C son seis veces superiores a los observados en sujetos control. Estos niveles se correlacionan con un incremento de los niveles de las citocinas proinflamatorias, IL-1 β e IL-6 y de la expresión en linfocitos T de ciclofilinas A y B y de su receptor.

RESUMO

A Tese de doutoramento titulada "Modulación farmacolóxica de enfermidades con base inflamatoria con compostos de orixe mariña" describe o papel das ciclofilinas A, B e C, así como o receptor de membrana CD147 nas células do sistema inmunitario e en enfermidades relacionadas coa inflamación. Ademais, detállase o potencial antiinflamatorio, nos modelos celulares de inflamación, de compostos naturais illados das esponxas *Characella pachastrelloides*, *Narrabeena nigra* e *Stylissa* aff. *carteri* e o coral *Zoanthus* cf. *pulchellus* e afonda nas vías que modulan a anhidroexfoliamicina, un composto obtido a partir de *Streptomyces* sp., a gracilina L illada da esponxa *Spongionella gracilis* e dous análogos sintéticos. Neste sentido, a inflamación e especialmente a inflamación crónica son un compoñente común de moitas enfermidades. Nas últimas décadas, a inflamación estivo relacionada coa patoloxía de varios trastornos crónicos, como o cancro, a diabetes, a artrite reumatoide, as enfermidades neurodexenerativas e algunhas enfermidades cardiovasculares. Ademais, as ciclofilinas e especialmente a ciclofilina A, son proteínas que participan no proceso inflamatorio, pero o seu papel nestas patoloxías aínda non está ben definido. O único fármaco modulador das ciclofilinas é o inmunosupresor ciclosporina A, con efectos secundarios significativos. Polo tanto, é necesario determinar a función das ciclofilinas e a súa relación con outros compoñentes da resposta inflamatoria. Ademais, dende o punto de vista farmacolóxico, a identificación de novos compostos con actividade antiinflamatoria que poden servir como moléculas guía é de grande interese.

Para o estudo dos efectos de compostos de orixe mariña, utilízanse como modelos celulares de inflamación e neuroinflamación as liñas celulares de neuroblastoma e microglia e os cultivos primarios de linfocitos T humanos purificados a partir de sangue de doantes. Dos 32 compostos naturais estudados, 19 presentan unha gran actividade antiinflamatoria e teñen un potencial efecto neuroprotector. A anhidroexfoliamicina reduce a produción de especies reactivas de osíxeno, a liberación de mediadores inflamatorios e a expresión de encimas inflamatorios. Ademais, modula a translocación do citosol ao núcleo de factores de transcrición implicados no proceso inflamatorio. Este composto cambia o fenotipo da microglía M1 activada ao seu estado M2, inhibindo a resposta inflamatoria cun efecto neuroprotector.

Para determinar o papel das ciclofilinas na inflamación, estúdanse os seus niveis nos linfocitos T humanos. Obsérvase que, en condicións de inflamación, a liberación ao medio extracelular e a expresión intracelular das ciclofilinas A, B e C aumenta significativamente. Ademais, tamén está aumentada a expresión do receptor de membrana CD147. Estes incrementos se inhiben en presenza da gracilina L e os dous análogos sintéticos (moduladores selectivos da ciclofilina A). Estes compostos impiden a migración das células T en presenza de

axentes quimiotáticos. A actividade antiinflamatoria destes compostos tamén se observa nas células microgliais, debido a un efecto mediado pola ruta da ciclofilina A. No soro dos pacientes con enfermidade das arterias coronarias, un modelo de enfermidade baseada na inflamación, os niveis de ciclofilina A e C son seis veces superiores aos observados en suxeitos control. Estes niveis correlaciónanse cun aumento nos niveis de citocinas proinflamatorias, IL-1 β e IL-6 e a expresión en linfocitos T de ciclofilinas A e B e o seu receptor.

SUMMARY

The Doctoral Thesis entitled "Pharmacological modulation of inflammatory-based diseases with marine compounds" describes the role of cyclophilins A, B and C, as well as the membrane receptor CD147 in cells of the immune system and in inflammatory-related diseases. In addition, the anti-inflammatory potential of natural compounds isolated from the sponges *Characella pachastrelloides*, *Narrabeena nigra* and *Stylissa* aff. *carteri* and the coral *Zoanthus* cf. *pulchellus*, and delves into the pathways that modulate anhydroexfoliamycin, a compound obtained from *Streptomyces* sp., gracillin L isolated from the sponge *Spongionella gracilis*, and two synthetic analogues is checked in inflammatory models. In this sense, inflammation and especially chronic inflammation are a common component of many diseases. In recent decades, inflammation has been linked to the pathology of several chronic disorders, such as cancer, diabetes, rheumatoid arthritis, neurodegenerative diseases, and some cardiovascular disorders. Furthermore, cyclophilins and especially cyclophilin A, are proteins that participate in the inflammatory process, but their role in these pathologies is not yet well defined. The only modulator drug for cyclophilins is the immunosuppressant cyclosporine A, with significant side effects. Therefore, it is necessary to determine the function of cyclophilins and their relationship with other components of the inflammatory response. Furthermore, from the pharmacological point of view, the identification of new compounds with anti-inflammatory activity that can serve as guide molecules is of great interest.

For the study of the effects of compounds of marine origin, neuroblastoma and microglia cell lines and primary cultures of human T lymphocytes purified from donor blood are used as cellular models of inflammation and neuroinflammation. 32 of the natural compounds studied, 19 show great anti-inflammatory activity and have a potential neuroprotective effect. Anhydroexfoliamycin reduces the production of reactive oxygen species, the release of inflammatory mediators, and the expression of inflammatory enzymes. Furthermore, it modulates the translocation from the cytosol to the nucleus of transcription factors involved in the inflammatory process. This compound changes the phenotype M1 of activated microglia to its M2 state, inhibiting the inflammatory response, with a neuroprotective effect.

To determine the role of cyclophilins in inflammation, their levels are studied in human T lymphocytes. It is observed that, under conditions of inflammation, the release to the extracellular media and the intracellular expression of cyclophilins A, B and C is significantly increased. In addition, the expression of the membrane receptor CD147 is also elevated. These increases are inhibited in the presence of gracillin L and the two synthetic analogues (selective modulators of cyclophilin A). These compounds prevent T cell migration in the presence of chemotactic agents. The anti-inflammatory activity of these compounds is also observed in

microglial cells, due to an effect mediated by the cyclophilin A pathway. In the serum of patients with coronary artery disease, an inflammatory-based disease model, cyclophilin levels A and C are six times higher than those observed in control subjects. These levels correlate with an increase in the levels of the proinflammatory cytokines, IL-1 β and IL-6 and the expression in T lymphocytes of cyclophilins A and B and their receptor.



1. INTRODUCCIÓN

La inflamación es un proceso complejo y dinámico, que se puede definir como la respuesta protectora primaria del sistema inmune frente a estímulos químicos, biológicos y/o físicos. El principal objetivo de la inflamación es la protección frente a cualquier invasión microbiana, a la entrada de antígenos, a lesiones o a daños celulares y tisulares. La respuesta inflamatoria controlada es un proceso beneficioso y necesario para la eliminación de estímulos perjudiciales, restaurar la fisiología normal y mantener la homeostasis tisular¹. La iniciación y resolución de la inflamación está regulada por una cascada molecular compleja. Este proceso también involucra diferentes tipos celulares y mediadores pro y antiinflamatorios que se coordinan para mediar la quimiotaxis, migración y proliferación celular. Sin embargo, una respuesta inflamatoria descontrolada o un fallo de la inflamación aguda a la hora de regular los estímulos proinflamatorios puede dar lugar a inflamación crónica, autoinmunidad y a un daño excesivo en los tejidos². Esta respuesta inflamatoria exacerbada es perjudicial para enfermedades como la osteoartritis, la artritis reumatoide, la enfermedad inflamatoria intestinal, la enfermedad de Crohn o el cáncer³⁻⁵. Además, la inflamación crónica y persistente, así como la respuesta autoinmune están asociadas con la aterosclerosis, el infarto de miocardio, el fallo cardíaco crónico, las enfermedades neurodegenerativas, el asma, la diabetes mellitus, la psoriasis, la progresión tumoral y con daños en el ADN, entre otras⁶⁻⁸.

1.1. LA RESPUESTA INFLAMATORIA

La respuesta inflamatoria está integrada por cuatro componentes relacionados entre sí. De esta forma, los inductores inflamatorios, primer componente, son detectados por los sensores. Este segundo componente de la respuesta inflamatoria estimula la producción de mediadores en los tejidos diana afectados (figura 1). Cada componente se puede presentar en múltiples formas y sus diferentes combinaciones desencadenan diferentes vías inflamatorias¹. El tipo de vía que se origina depende de la naturaleza del desencadenante inflamatorio. Por ejemplo, las bacterias son detectadas por receptores del sistema inmunitario innato, como los receptores tipo Toll (TLR, del inglés *Toll-like receptor*) e inducen la producción de citocinas inflamatorias, quimiocinas y prostaglandinas. Estos mediadores actúan sobre los tejidos diana, incluyendo los vasos sanguíneos locales e inducen vasodilatación, extravasación de neutrófilos y plasma al tejido infectado. Tanto los neutrófilos procedentes de la circulación, como los macrófagos situados en los tejidos locales y mastocitos buscan al patógeno invasor y lo destruyen. Las citocinas inflamatorias, cuando se secretan en grandes cantidades, pueden tener efectos a nivel sistémico promoviendo la producción de la proteína reactiva C y factores de coagulación y a su vez activan la producción de prostaglandinas. De esta forma, se produce fiebre, anorexia, somnolencia y fatiga⁹.

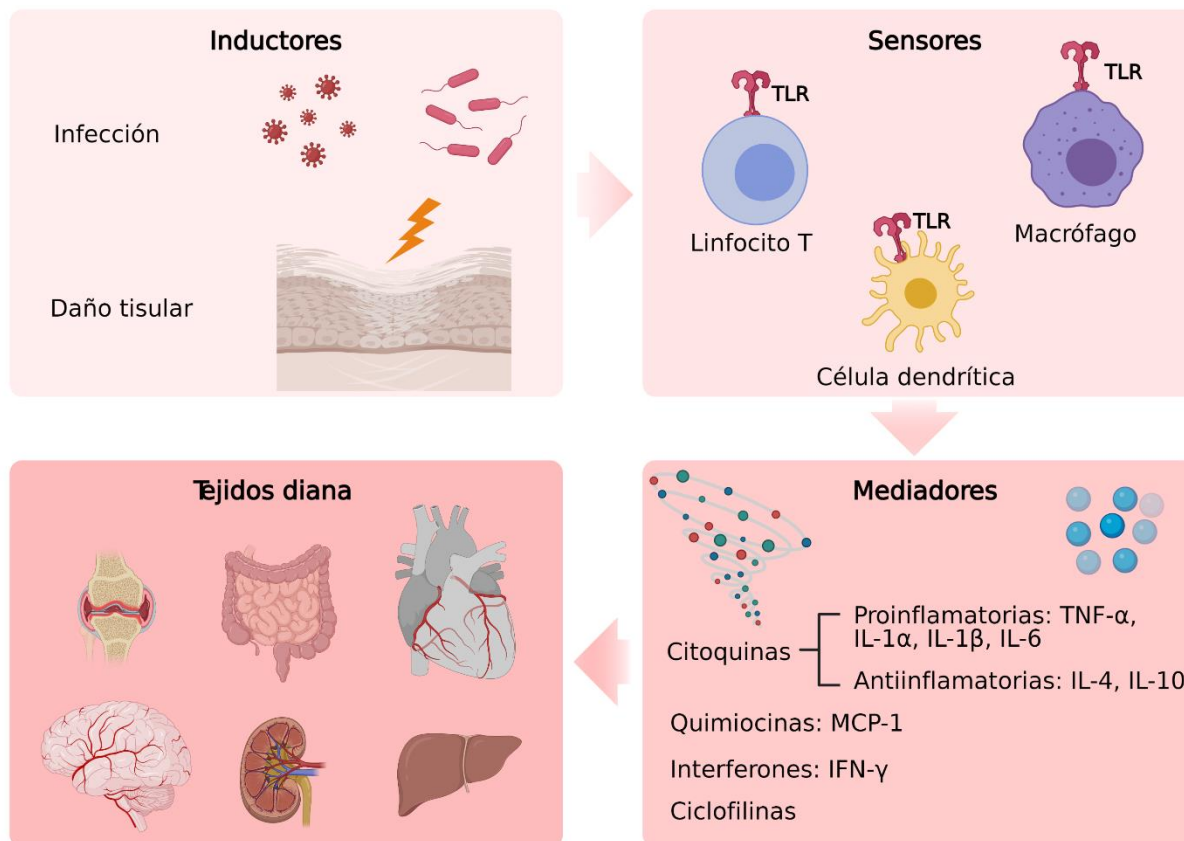


Figura 1. Componentes de la respuesta inflamatoria. La respuesta inflamatoria se inicia por la estimulación de inductores inmunes, que son reconocidos por sensores (p. ej., TLR en las células inmunes), seguido de la secreción de mediadores inflamatorios (p. ej., citoquinas, quimiocinas, interferones y Cyps), y finalmente estos mediadores provocan sus efectos sobre los tejidos diana. IFN, interferón; IL, interleucina; MCP-1, molécula quimioatrayente de monocitos 1; TLR, receptor tipo Toll; TNF, factor de necrosis tumoral

La respuesta inflamatoria aguda normalmente finaliza una vez que la agresión desencadenante desaparece y se repara el tejido dañado. La transición de la fase inflamatoria a un estado de homeostasis es un proceso activo y coordinado denominado resolución de la inflamación. Hay varios mecanismos clave en la regulación de la resolución, incluido el cambio de prostaglandinas proinflamatorias a lipoxinas antiinflamatorias. Este cambio, a su vez, promueve el reclutamiento de monocitos en vez de neutrófilos, que da lugar a la eliminación de células muertas y otros desechos, iniciándose la reparación de los tejidos afectados¹⁰. Sin embargo, si la respuesta inflamatoria aguda es incapaz de eliminar al desencadenante inflamatorio o persiste por cualquier otro motivo, es posible que no se produzca correctamente la resolución de la inflamación, dando lugar a un estado inflamatorio crónico. Este estado puede estar causado por infecciones crónicas, alérgenos persistentes, tejidos dañados no reparados, partículas extrañas no digeridas o por la acumulación de cristales endógenos, como el urato monosódico^{11, 12}. En estos casos, la respuesta inflamatoria crónica se suele localizar donde está presente el inductor inflamatorio, y con frecuencia da lugar a remodelación tisular local. Por ejemplo, una infección persistente puede derivar en la generación de granulomas y la consiguiente formación de órganos linfoides terciarios en el lugar de la lesión¹³.

Por otro lado, cada vez se describen más procesos inflamatorios crónicos en los cuales el desencadenante inicial no está bien definido, pero no parece implicar infección o daño tisular.

Estos procesos inflamatorios son de particular interés, porque, como se ha comentado antes, acompañan a numerosas enfermedades, entre las que destacan la diabetes mellitus tipo II, la aterosclerosis, algunas enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas y el cáncer. Además, en estos procesos inflamatorios parece haber un círculo vicioso entre la inflamación y el estado patológico. Por ejemplo, la obesidad puede promover la inflamación y a su vez la inflamación crónica puede provocar la diabetes asociada a la obesidad al inducir resistencia a la insulina. En la aterosclerosis, el cáncer y otras enfermedades inflamatorias crónicas existen circuitos de retroalimentación positiva parecidos¹⁴.

1.1.1. Células implicadas en la inflamación

El sistema inmune innato representa la primera línea de defensa contra los patógenos invasores. La respuesta del sistema innato consiste en una defensa física, química y celular rápida contra los patógenos para impedir su propagación a través del cuerpo. Por otro lado, el sistema inmune adaptativo representa la segunda línea de defensa y consiste en una respuesta específica hacia los patógenos presentados. Las células del sistema inmune más importantes del proceso inflamatorio derivan de las células madre hematopoyéticas, las cuales se dividen en células mieloides y linfoides¹⁵.

1.1.1.1. El linaje mieloide

Las células progenitoras mieloides, como se muestra en la figura 2, son los precursores de macrófagos, granulocitos (los cuales engloba a neutrófilos, basófilos y eosinófilos), mastocitos y células dendríticas. Los macrófagos, granulocitos y las células dendríticas participan en el proceso fagocítico. Las células progenitoras mieloides también son precursoras de los megacariocitos y de los eritrocitos, o glóbulos rojos. Estas células forman parte del sistema inmunitario innato aunque los macrófagos y las células dendríticas pertenecen tanto al innato como al adaptativo¹⁵.

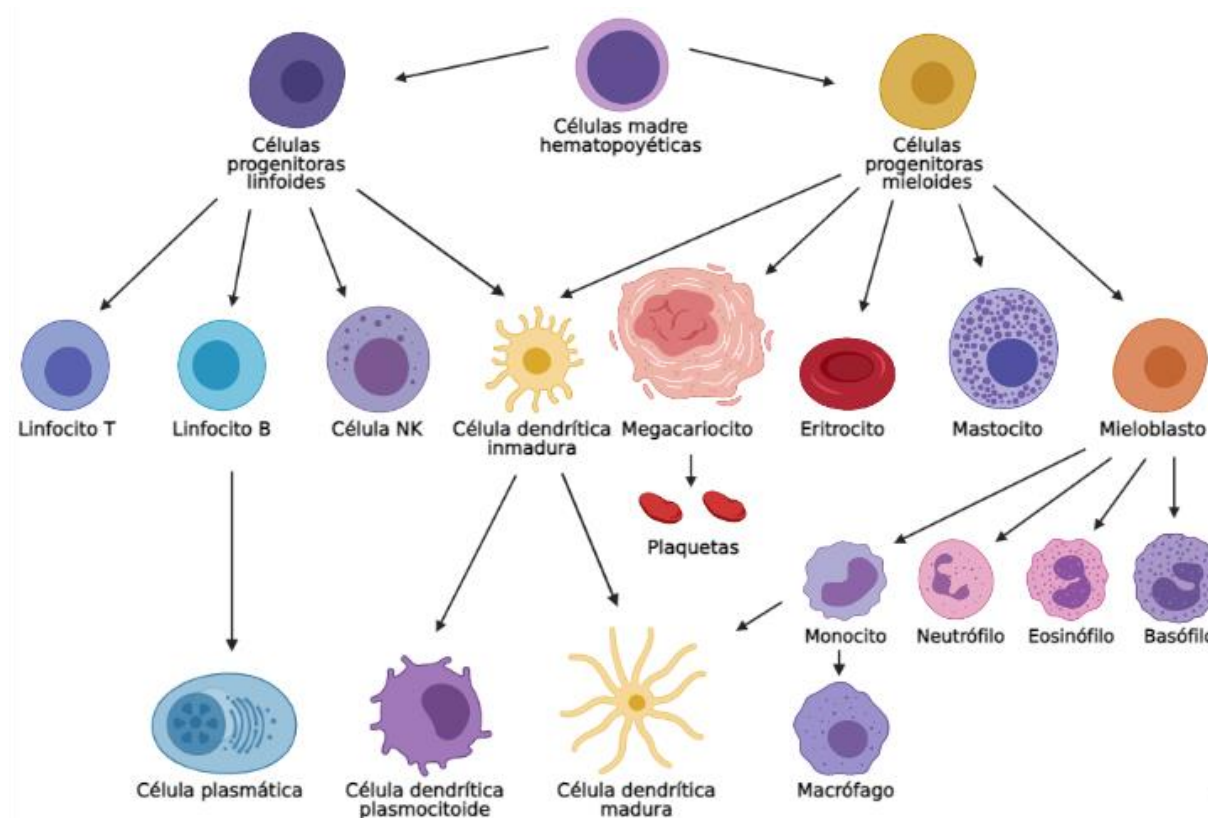


Figura 2. Elementos celulares de la sangre, incluidas las células del sistema inmunológico, cuyas células precursoras son las células madre hematopoyéticas pluripotentes de la médula ósea. Estas células hematopoyéticas se dividen para producir dos tipos de células madre, las células progenitoras linfoides y las células progenitoras mieloides. Las primeras dan lugar a los linfocitos T, B y células NK. Las segundas dan lugar a las plaquetas, eritrocitos, mastocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y macrófagos. La mayoría de las células dendríticas derivan de las células progenitoras mieloides, pero también pueden derivar de las células progenitoras linfoides.

Los granulocitos, también denominados leucocitos polimorfonucleares, se dividen en: neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Estas células se encargan de fagocitar y destruir numerosos microorganismos. Además, los eosinófilos y basófilos desempeñan un papel importante en la defensa contra parásitos y contribuyen en las reacciones alérgicas inflamatorias^{15, 16}.

Los mastocitos migran como precursores inmaduros hasta los tejidos periféricos, como la piel, el intestino y la mucosa de las vías respiratorias, donde maduran. Sus gránulos contienen numerosos mediadores inflamatorios, como la histamina y varias proteasas y participan en las reacciones alérgicas inflamatorias¹⁷.

Las células dendríticas tienen función fagocítica e incluyen varios linajes cuyas funciones aún están por determinar. Sin embargo, su principal función en el sistema inmunológico no es la fagocitosis, sino que destacan por ser células presentadoras de antígeno¹⁵. Las células dendríticas sirven de puente entre la inmunidad innata y adaptativa. Cuando se activan, producen una serie de mediadores que sirven para activar a otras células inmunes, sobre todo participan en la activación de los linfocitos T¹⁸.

Las plaquetas son fundamentales en los procesos de hemostasia y trombosis¹⁵. Estas células son las primeras en responder ante daños en los vasos sanguíneos, donde se unen rápidamente

a componentes de la matriz extracelular expuesta a causa de los daños en el endotelio, donde se activan y estimulan la coagulación¹⁹.

Los macrófagos tienen una vida larga y realizan varias funciones como la fagocitosis de organismos invasores. Además, participan en el inicio de la inflamación y producen mediadores inflamatorios que atraen a otras células del sistema inmune y las activan. Estas células también actúan como células “scavenger” (carroñeras) en el cuerpo, se encargan de fagocitar células muertas y restos celulares¹⁵. Una vez en los tejidos, los macrófagos pueden adoptar diferentes fenotipos, dentro de un rango, entre el fenotipo M1 proinflamatorio y el M2 antiinflamatorio, como ocurre con las células de la microglía²⁰.

La microglía es un tipo de célula glial, semejante a los macrófagos, ya que también se encargan de la defensa y la reparación de tejidos. Estas células son una pieza fundamental en la inflamación cerebral y en las enfermedades neurodegenerativas inflamatorias. La activación de la microglía es el principal componente de la neuroinflamación en el sistema nervioso central, las cuales proporcionan la primera línea de defensa. La microglía se puede activar en presencia de patógenos, daños tisulares, neurotoxinas, infecciones, daños o estímulos anómalos²¹. La activación de la microglía, del mismo modo que ocurre con los macrófagos, da lugar a diferentes fenotipos funcionales que van desde el fenotipo M1 proinflamatorio hasta el M2 inmunosupresor. El paradigma M1/M2 es un modelo simplificado para explicar las dos polaridades de la respuesta inflamatoria por parte de las células de la microglía. Dependiendo del medio o de los factores que estimulen a la microglía, ésta puede presentar varios estados de "activación clásica", "activación alternativa" y "desactivación adquirida". Durante la activación clásica, se producen citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF- α del inglés, *Tumor Necrosis Factor*) la interleucina (IL)-1 β , la IL-6, el NO y las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés, *Reactive Oxygen Species*) entre otros, y se denomina a este estado microglía M1²². El estado microglía M2 hace referencia a los estados de activación alternativa y desactivación adquirida. La activación alternativa está relacionada con los genes M2 antiinflamatorios que promueven la reparación de los tejidos y la reconstrucción de la matriz extracelular y destaca la liberación de IL-4, IL-10 e IL-13 (figura 3). En la activación alternativa están implicadas la proteína quinasa activada por AMP (AMPK, del inglés, *AMP-activated Protein Kinase*) y el factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2 del inglés, *Nuclear factor erythroid-2-Related Factor 2*)²³. Por otro lado, la desactivación adquirida es otro estado que alivia la inflamación aguda y es inducida principalmente por células en apoptosis o por ILs antiinflamatorias como la IL-10 y el TGF- β (figura 3)²⁴. Aún no está claro si hay diferencias morfológicas entre los dos fenotipos o si pueden coexistir los dos, pero sí que está demostrado que los dos fenotipos pueden transitar de uno a otro en determinadas contextos²⁵.

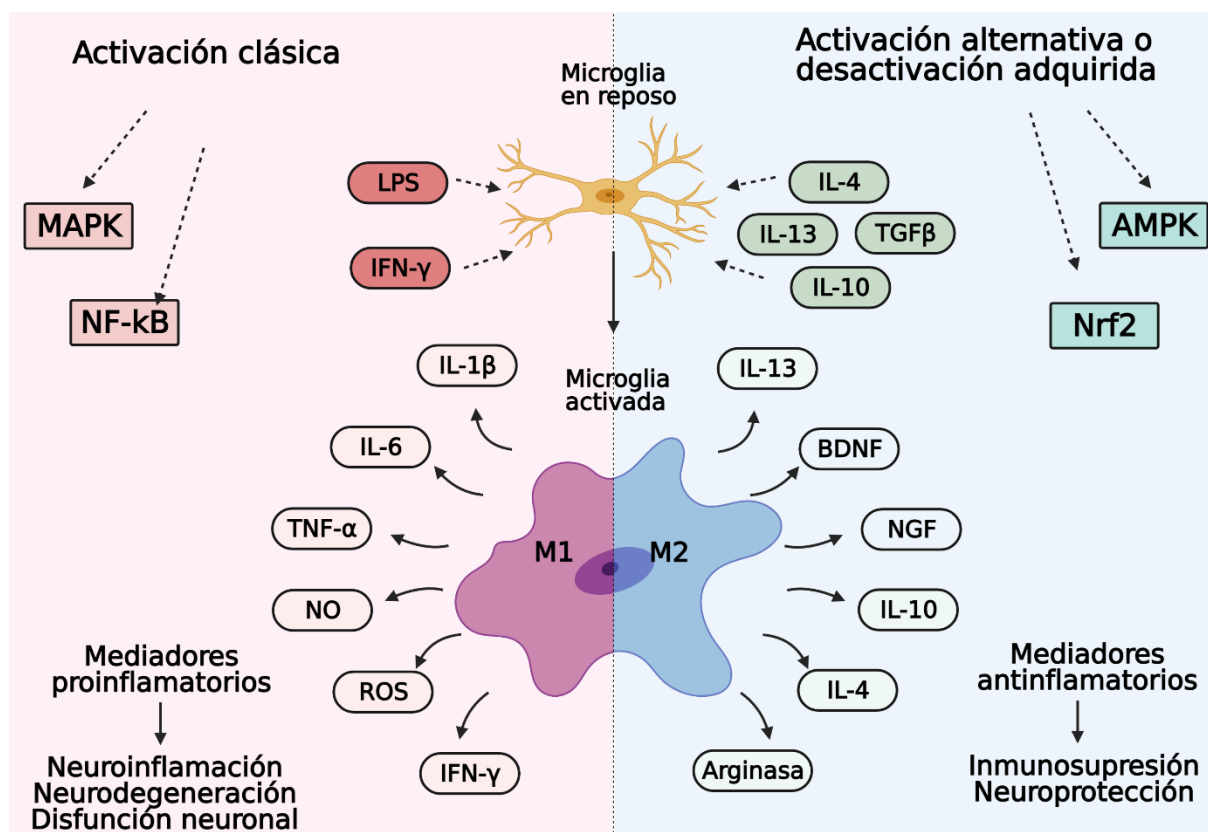


Figura 3. Activación microglía. Representación del fenotipo M1 proinflamatorio (izquierda) y M2 antiinflamatorio (derecha). En la activación clásica de la microglía se activan las vías de NF-κB y MAPK y se producen varios mediadores proinflamatorios, entre los que destacan IL-1β, IL-6, TNF-α, NO, ROS e IFNγ que son dañinos para las neuronas, pudiendo causar su muerte. Por otro lado, los estados de activación alternativa y desactivación adquirida, pertenecientes al fenotipo M2, se activan las vías de Nrf2 y AMPK, promoviendo la producción de mediadores antiinflamatorios e inmunosupresores y dando lugar la neuroprotección e inmunosupresión. AMPK, quinasa activada por AMP; BDNF, el factor neurotrófico derivado del cerebro; IFN, interferón; IL, interleucina; LPS, lipopolisacárido; MAPK, proteínas quinasa activadas por mitógenos; NF-κB, factor nuclear κB; NGF, factor de crecimiento nervioso; Nrf2, factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2; NO, óxido nítrico; ROS, especies reactivas de oxígeno; TGFβ, factor de crecimiento transformanteβ

La microglía puede ser activada por la vía clásica en presencia de lipopolisacárido (LPS), interferón (IFN)-γ, β-amiloide y/o α-sinucleína^{26, 27}. En respuesta, la microglía libera factores proinflamatorios y aumenta la producción de ROS y NO para eliminar los patógenos invasores, ya que representa la primera línea de defensa. Sin embargo, una acumulación excesiva de estos factores causada por una activación crónica de la microglía da lugar al daño neuronal, pudiendo causar la muerte de las neuronas^{27, 28}.

En la neurodegeneración, la microglía primeramente adopta el fenotipo M1 para destruir los patógenos invasores o lo que haya causado la activación de la inflamación. Después, para restaurar la homeostasis tisular tiene que activarse la fase antiinflamatoria y neuroprotectora, en la cual la microglía adopta el fenotipo M2, para que se produzca la fagocitosis de restos celulares y la cicatrización de las heridas. Por este motivo, es crucial que las células puedan cambiar del fenotipo M1 al M2. De lo contrario, se acumularían mediadores proinflamatorios con consecuencias nefastas para el cerebro²⁵.

1.1.1.2. El linaje linfoide

Las células progenitoras linfoides, son precursores de células NK (del inglés *Natural Killers*) y de los linfocitos B y T.

Las células NK juegan un papel muy importante en la respuesta inmune innata temprana a las infecciones, antes de que se llegue a desarrollar la respuesta inmune adaptativa. Estas células son capaces de identificar y eliminar células anormales (como células cancerígenas) y también producen ciertas citocinas^{15, 29}.

Los linfocitos B juegan un papel importante en el reconocimiento de moléculas extrañas al organismo, los antígenos, y la producción de anticuerpos para neutralizarlos. Al igual que los linfocitos T, estas células pertenecen al sistema inmune adaptativo. Las células B se almacenan en los tejidos linfoides donde entran en contacto con los antígenos³⁰. Después de la unión de los linfocitos B al antígeno, las células pueden proliferar y diferenciarse a células plasmáticas. Las células plasmáticas secretan anticuerpos que se unen al antígeno causante de su activación. Por otro lado, cuando se activan pueden diferenciarse a células de memoria, que serán las que en un futuro reaccionarán, de forma más específica y rápida al mismo antígeno¹⁵.

Los linfocitos o células T son un componente importante de la respuesta del sistema inmune adaptativo, participando en la eliminación de patógenos, la vigilancia de tumores y la memoria inmunológica y también intervienen en la regulación de la homeostasis. Estas células, además, están implicadas en la patogénesis de muchas enfermedades inflamatorias y autoinmunes¹⁵.

En la médula ósea, a partir de las células madre hematopoyéticas, se originan las células progenitoras linfoides que migran al timo, donde proliferan y maduran a linfocitos T. El receptor de los linfocitos T (TCR, del inglés, *T-Cell Receptor*), es el responsable del reconocimiento del antígeno. El TCR reconoce los péptidos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (pCMH) expresados en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APCs, del inglés, *Antigen Presenting Cells*). Los TCRs son capaces de reconocer distintos ligandos con diferente rango de afinidades³¹. Dependiendo de la afinidad de la interacción TCR-pCMH, se desencadenan diferentes vías de señalización.

Cuando un linfocito T se une por primera vez a un antígeno, prolifera y se diferencia en uno de los tipos funcionales. De esta forma, las células T se pueden dividir y diferenciarse en linfocitos T citotóxicos (o linfocitos CD8+), en linfocitos T colaboradores (o linfocitos CD4+) o en linfocitos T reguladores. Además, del mismo modo que ocurre con los linfocitos B, las células T también pueden diferenciarse en linfocitos T de memoria^{31, 32}.

Para una respuesta apropiada de las células T es necesaria una señalización adecuada del TCR. Esta señalización está regulada por un conjunto de mecanismos bioquímicos que pueden proporcionar una retroalimentación positiva o negativa, dando lugar a una amplificación o atenuación, respectivamente, de la señal. Aunque estos mecanismos son complejos y diversos, pueden controlar, por un lado, la regulación de efectores de señalización temprana, como las quinasas y fosfatasa. También controlan el desarrollo y regulación específica de las moléculas de señalización y, por último, regulan la intensidad de las señales mediadas por TCR³³.

1.1.2. Mediadores inflamatorios, receptores y principales vías de señalización

Las moléculas inflamatorias, entre las que destacan los factores de transcripción, las moléculas de adhesión, las quimiocinas, las ILs, las metaloproteasas de matriz (MMPs del

inglés, *Matrix MetalloProteinases*) y $\text{TNF-}\alpha$ son moléculas que hacen de vínculo entre la inflamación aguda y las enfermedades crónicas. Por este motivo, a continuación, se describen algunos mediadores, receptores y las principales vías de señalización implicados en las enfermedades inflamatorias.

1.1.2.1. Citocinas

Las citocinas son las principales proteínas de señalización ante un estímulo inflamatorio. Éstas actúan sobre las células a través de receptores transmembrana de la superficie celular. La unión de la citocina al receptor desencadena una respuesta celular que inducen la transcripción de nuevos genes y la síntesis de proteínas³⁴. Las citocinas se clasifican en ILs, quimiocinas, IFNs, factores de necrosis tumoral (TNF, del inglés, *Tumor Necrosis Factor*), factores de crecimiento y factores estimulantes de colonias. Las citocinas, a su vez, se pueden dividir en citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-15, IL-17, IL-23, $\text{TNF-}\alpha$) y citocinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10, IL-13, $\text{IFN-}\gamma$)³⁵.

El **$\text{TNF-}\alpha$** es uno de los mediadores de inflamación más importante de entre las citocinas y ejerce numerosos efectos sobre células inmunes, endoteliales o fibroblastos y participa en la homeostasis celular. Cuando los linfocitos T o macrófagos se activan, pueden secretar $\text{TNF-}\alpha$ ³⁶. De esta forma, el $\text{TNF-}\alpha$, mediante un mecanismo de retroalimentación positiva, induce la liberación de más $\text{TNF-}\alpha$ y otros mediadores inflamatorios, como la IL-8³⁷. Además, esta citocina juega un papel importante en muchos procesos fisiológicos, como la supervivencia celular, la inducción de la apoptosis o necrosis y como mediador intercelular³⁸. Sin embargo, el $\text{TNF-}\alpha$, a través de la inducción de la liberación de mediadores inflamatorios y proteasas, puede causar daño directo en el ADN³⁶. Esta citocina no suele detectarse en sujetos sanos, sin embargo, es frecuente que esté presente en niveles altos en el suero de pacientes con infecciones o alguna enfermedad con base inflamatoria, y sus niveles se correlacionan con la severidad de la patología³⁹⁻⁴¹. El $\text{TNF-}\alpha$ actúa a través de dos receptores: el receptor de $\text{TNF-}\alpha$ (TNFR, del inglés, *TNF Receptor*) 1, presente en la mayoría de las células humanas y el TNFR2, presente solo en las células endoteliales y del sistema inmune⁴⁰. Ambos receptores pueden activar la transcripción del factor nuclear de células T activadas (NF- κ B del inglés, *Nuclear Factor of Activated T cells*) o inducir la activación de las proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPKs del inglés, *Mitogen Activated Protein Kinases*), pero las señales desencadenadas por cada receptor son diferentes. Las vías proinflamatorias y de muerte celular activadas por el $\text{TNF-}\alpha$ y asociadas al daño tisular están mediadas por el TNFR1, mientras que, a través del receptor TNFR2, $\text{TNF-}\alpha$ promueve la reparación tisular y la angiogénesis³⁸.

Las **ILs** también desempeñan un papel importante en la modulación inmunitaria. Dentro de la familia **IL-1**, las **IL-1 α** e **IL-1 β** están implicadas en la producción de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS, del inglés, *Reactive Nitrogen Species*), en la síntesis de moléculas inflamatorias como las quimiocinas, integrinas y MMPs extracelular durante los procesos inflamatorios o cancerosos⁴². Por otro lado, a través de la estimulación de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), inducen la producción de prostaglandinas y a través de la estimulación de la enzima inducible de óxido nítrico sintasa (iNOS, del inglés, *inducible Nitric Oxide Synthase*), promueven la producción de NO. Además, fomentan la expresión de numerosas citocinas y moléculas de adhesión de leucocitos y activan las células involucradas en la respuesta inmune⁴³. Ambas IL-1 α e IL-1 β , están relacionadas con la patogénesis de diferentes enfermedades

cardiovasculares. Por un lado, inducen una respuesta inflamatoria por parte de las células endoteliales (CEs) y estimulan las moléculas de adhesión que atraen a los leucocitos, incluyendo la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1 del inglés *Intercellular Adhesion Molecule-1*) y la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1 del inglés *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*). También inducen la producción de quimiocinas, como la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1, del inglés, *Monocyte Chemoattractant Protein-1*) e inducen la proliferación de las células del músculo liso vascular (VSMCs, del inglés, *Vascular Smooth Muscle Cells*), participando en la formación de las placas de ateroma^{44, 45}.

La **IL-6** es una citocina proinflamatoria que está implicada en la expresión de numerosas proteínas responsables de la inflamación aguda y participa en la proliferación y diferenciación celular⁴⁶. Los monocitos y macrófagos son los principales productores de IL-6⁴⁷. Esta citoquina pleiotrópica, participa en varios procesos inmunes y fisiológicos, como la inflamación, la respuesta inmunitaria específica frente antígenos, la hematopoyesis, la apoptosis, la diferenciación y el metabolismo celular^{47, 48}. En condiciones inflamatorias o de infección, TNF- α o la IL-1 inducen la secreción de IL-6, aunque también puede estar inducida por la estimulación de los TLR por agentes microbianos. Su inducción y liberación también depende de varios factores de transcripción como el NF- κ B^{2, 49, 50}.

De entre las ILs antiinflamatorias destacan la **IL-4** e **IL-10**. La IL-4 es una citocina pleiotrópica, principalmente producida por los linfocitos T activados, mastocitos y basófilos. La IL-4 reduce la activación de varias células del sistema inmune al reducir la liberación de citocinas proinflamatorias y aumentar la liberación de otras antiinflamatorias⁵¹. La IL-10 desempeña una función importante en la regulación de la proliferación y diferenciación de varias células inmunes, además, limita y frena la respuesta inflamatoria, lo que es esencial en el cáncer y en enfermedades autoinmunes e inflamatorias⁵². Ambas ILs, promueven la polarización de los macrófagos y las células de la microglía hacia su fenotipo antiinflamatorio M2⁵³.

Las **quimiocinas** son citocinas quimioatrayentes que se producen en grandes cantidades en respuesta a estímulos inflamatorios e infecciosos⁵⁴. Se han descrito más de 50 quimiocinas y 18 receptores en humanos. De esta forma, debido al gran número de quimiocinas y receptores, así como sus incontables posibles interacciones, existen un sinnúmero de funciones fisiológicas las que participan. Los leucocitos reclutados a los tejidos dañados en el proceso inflamatorio agudo pueden producir otras quimiocinas que contribuye a atraer a otros leucocitos, ampliándose la señal quimioatrayente³⁵. Las quimiocinas también son producidas por muchos tejidos dañados en determinadas enfermedades. Por lo que, a pesar de sus efectos beneficiosos, también desempeñan funciones importantes en la patogénesis de enfermedades inflamatorias e inmunes, así como en la progresión de los tumores⁵⁴⁻⁵⁷. La quimiocina **IL-8** desempeña funciones esenciales en la respuesta inflamatoria y su síntesis está mediada por el TNF- α , la IL-1 β , hipoxia y hormonas esteroideas. A parte de ser un potente quimioatrayente, también es capaz de activar células del sistema inmune, como neutrófilos y linfocitos T⁵⁸. Otra potente quimiocina proinflamatoria es la **MCP-1**, que atrae sobre todo a monocitos, macrófagos y linfocitos. Esta quimiocina está muy asociada a enfermedades crónicas⁵⁹. Por otro lado, los linfocitos T, días después de ser activados expresan la quimiocina **RANTES** (del inglés, *Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Ecreted*), la cual participa en un amplio rango de enfermedades inflamatorias⁶⁰.

Los **IFNs** son macromoléculas implicadas tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa. Estas moléculas tienen capacidad antiviral y actúan contra numerosas enfermedades⁶¹. Hay tres tipos de IFNs, los IFN tipo I, II y III. El IFN tipo II, también conocido como IFN γ está producida mayormente por los linfocitos T y activa a los macrófagos, a las células NK y a los linfocitos B⁶². IFN γ es entre 100 y 1000 veces más potente como inmunomodulador que otros tipos de IFNs. Además, está involucrado en la iniciación y modulación de numerosas respuestas inmunes, muchas de las cuáles son proaterogénicas. Además, la IFN γ al activar los macrófagos, estimula la liberación de citocinas proinflamatorias, como el TNF α y IL-6, radicales de oxígeno y metaloproteasas⁶³.

Los **factores estimulantes de colonias** promueven la formación de colonias mieloides y las regulan. Dentro de estos, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, del inglés, *Grannulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) sirve como vía de comunicación entre los linfocitos que invaden un tejido inflamado y las células mieloides. GM-CSF es liberado principalmente por linfocitos T, CEs, células dendríticas y macrófagos en condiciones de inflamación y promueve la polarización de los macrófagos hacia su fenotipo M1 proinflamatorio. Las citocinas proinflamatorias inducen la expresión de GM-CSF, mientras que las antiinflamatorias inhiben su expresión⁶⁴.

Los **factores de crecimiento** son clase de productos génicos que desempeñan un papel clave en la división celular y la proliferación de tejidos. Por otro lado, también y desempeñan funciones esenciales en el inicio, desarrollo, mantenimiento y resolución de la respuesta inmunitaria. Uno de los factores de crecimiento más relacionados con los procesos inflamatorios son el factor de crecimiento transformante β y el factor de crecimiento vascular endotelial^{64, 65}. En el cerebro, los factores de crecimiento más importantes son el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés, *Brain-Derived Neurotrophic Factor*) y el factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés, *Nerve Growth Factor*)⁶⁶.

1.1.2.2. Moléculas de adhesión

Las moléculas de adhesión se encargan de mediar en la adhesión y extravasación de leucocitos y desempeñan una labor fundamental en la respuesta inflamatoria. Las CEs en condiciones normales expresan niveles basales de estas moléculas y resisten la adhesión de leucocitos⁶⁷. Sin embargo, cuando las CEs son activadas, aumentan la expresión en su superficie de moléculas de adhesión, incluyendo la **selectina E**, **ICAM-1** y **VCAM-1**. La activación de las CEs está mediada por el incremento de las citocinas proinflamatorias y por factores de transcripción como el NF- κ B. De esta forma, ICAM-1 y la selectina E, promueven la adhesión y activación plaquetaria. Estos estímulos inducen el depósito de plaquetas que interviene principalmente en la progresión de la aterosclerosis. Además, la secreción de estas moléculas quimiotácticas también da lugar a la expresión de receptores de adhesión que favorecen el reclutamiento y la trans migración hacia la pared arterial de linfocitos T y monocitos⁶⁸.

Una vez que los leucocitos están activados se unen firmemente a las CEs. La principal función de VCAM-1 es servir como molécula de adhesión celular entre las integrinas que expresan los leucocitos en su superficie y las CEs. Estas integrinas también sirven como señales de transducción entre los linfocitos y las células endoteliales durante el desarrollo de la aterosclerosis y la artritis reumatoide. Asimismo, VCAM-1 puede contribuir a la migración transendotelial de leucocitos, formando un espacio entre CEs adyacentes⁶⁹.

Por otro lado, ICAM-1 es una proteína transmembrana expresada por leucocitos y CEs para para estabilizar las interacciones celulares y promover la migración de los leucocitos a través de los tejidos endoteliales. Los receptores de ICAM-1 también pertenecen a la familia de las integrinas y están expresados en la superficie de los leucocitos donde también sirven como moléculas de señalización de los sitios de inflamación⁷⁰. De esta manera, actúa como intensificador de la señal local de los procesos inflamatorios⁷¹.

1.1.2.3. Metaloproteinasas de matriz (MMPs)

Las MMPs son unas enzimas de la familia de las endopeptidasas dependientes de zinc y son secretadas por diferentes tipos celulares, entre los que destacan los fibroblastos, VSMCs y leucocitos⁷². Las MMPs degradan las proteínas de la matriz extracelular, como el colágeno y la elastina. También pueden influir en la función de las CEs, así como en la migración, proliferación, señalización del calcio y contracción de las VSMCs. Estas enzimas desempeñan importantes funciones en la remodelación del tejido vascular en los procesos biológicos de angiogénesis, embriogénesis, morfogénesis y la reconstrucción de heridas⁷³. Normalmente las MMPs están reguladas por inhibidores tisulares endógenos de metaloproteasas y el ratio entre las MMPs y estos inhibidores determina el grado de degradación de la matriz extracelular y de la remodelación tisular⁷⁴.

1.1.2.4. Factores de transcripción y vías de señalización

Los factores de transcripción son componentes clave en la regulación de la expresión de mediadores proinflamatorios durante la inflamación. En este epígrafe se incluye la descripción de algunos factores de transcripción implicados en la respuesta inflamatoria.

El factor de transcripción **NF-κB** media la respuesta inflamatoria y participa tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa. NF-κB induce la expresión de genes proinflamatorios, incluyendo citocinas, regula la activación, diferenciación, proliferación y supervivencia celular de las células del sistema inmune y de otros tipos celulares⁷⁵. Como resultado de estos efectos en la fisiología celular, su regulación deficiente puede tener consecuencias graves que pueden derivar en enfermedades crónicas⁷⁶.

La familia NF-κB consta de cinco miembros, p50, p52, RelA (o p65), c-Rel y RelB, los cuales pueden formar varios heterodímeros y homodímeros, llegando a producir hasta 15 complejos de NF-κB⁷⁷. Estos dímeros median la transcripción de genes diana mediante la unión a elementos específicos del ADN. Los dímeros de NF-κB permanecen inactivos en el citoplasma, unidos una proteína inhibidora, el IκB. El miembro de la familia IκB más importante y mejor estudiado es el IκBα. Además, las proteínas precursoras de p50 y p51, el p100 y p105, sirven como proteínas similares a IκB y funcionan como inhibidores de NF-κB⁷⁸.

El primer paso de la activación de NF-κB, implica la modificación postraduccional de los inhibidores de IκB. Esta activación puede ocurrir por una vía clásica o tradicional o una alternativa. La vía tradicional, como muestra la figura 4, responde a diversos estímulos, incluyendo ligandos de varios receptores de citocinas, receptores de reconocimiento de patrones (PRR, del inglés, *Pattern-Recognition Receptors*), receptores de TNF, TCR y el receptor de linfocitos B⁷⁶. El primer mecanismo para la activación clásica de NF-κB requiere la activación de del complejo IκB quinasa (IKK, del inglés, *IκB kinasa*) que fosforila y degrada a las proteínas IκB⁷⁹. Tras su activación, IKK fosforila IκBα, lo que desencadena su degradación dependiente

de ubiquitina en el proteasoma. Esto da lugar a la liberación de los dímeros clásicos de NF- κ B, predominantemente p50/RelA y p50/c-Rel, al citosol, donde se translocan al núcleo de forma rápida y transitoria. En el núcleo estos dímeros se unen a secuencias de ADN específicas, promoviendo la transcripción de los genes diana^{76, 80}.

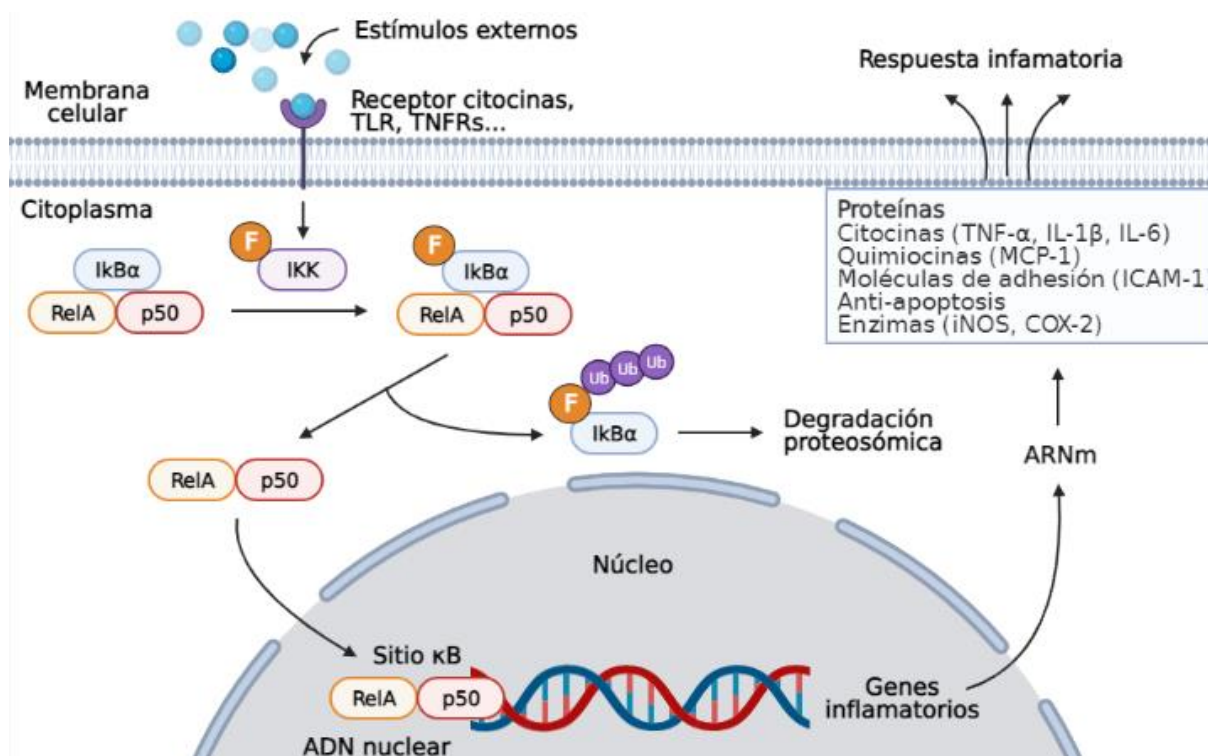


Figura 4. Ejemplo de la activación clásica de NF- κ B. Tras determinados estímulos externos, se activa IKK, que desencadena la fosforilación y degradación de las proteínas de I κ B (I κ B α en este caso) en el proteasoma. Esto da lugar a la liberación de los dímeros de NF- κ B (RelA/p50 en este caso), que se translocan al núcleo y se unen a secuencias específicas de ADN, promoviendo la transcripción de genes diana que dan lugar a la síntesis de proteínas que regulan la respuesta inflamatoria. COX-2, ciclooxigenasa-2; IKK, I κ B quinasa; IL, interleucina; iNOS, la enzima inducible de óxido nítrico sintasa; MCP-1, molécula quimioatrayente de monocitos 1; TLR, receptores tipo Toll; TNF, factor de necrosis tumoral; TNFR, receptor TNF

Por otro lado, la activación alternativa de NF- κ B responde a un grupo de estímulos más específicos, incluyendo ligandos de la superfamilia de receptores TNF⁸¹. La molécula central en esta vía es la quinasa inductora de NF- κ B (NIK, del inglés, *NF- κ B-Inducing Kinase*). NIK junto IKK α median la fosforilación, ubiquitinación y procesamiento de p100, lo que deriva en la maduración de p52 y la translocación nuclear del complejo p52/RelB^{76, 81}. Funcionalmente, la vía clásica está relacionada con casi todos los procesos de la respuesta inmune, mientras que la vía alternativa coopera como eje de señalización en la regulación de funciones específicas del sistema inmune adaptativo⁸².

Una vez que los dímeros llegan al núcleo, ya sea por la vía clásica o alternativa, se promueve la transcripción de genes diana implicados en el desarrollo y progresión de la inflamación. Además, NF- κ B, como muestra la figura 5, no solo aumenta la producción de citocinas inflamatorias, quimiocinas o moléculas de adhesión, sino que también regula la proliferación, el ciclo celular, apoptosis, angiogénesis y diferenciación celular⁷⁷. Las células dendríticas o los macrófagos dependen de NF- κ B para secretar citocinas proinflamatorias

después de la activación de PRRs. NF- κ B también es un importante factor de transcripción antiapoptótico para células del sistema inmune, como los neutrófilos, y es importante para el desarrollo de los linfocitos. Por otro lado, también pueden ejercer funciones antiinflamatorias⁸³.

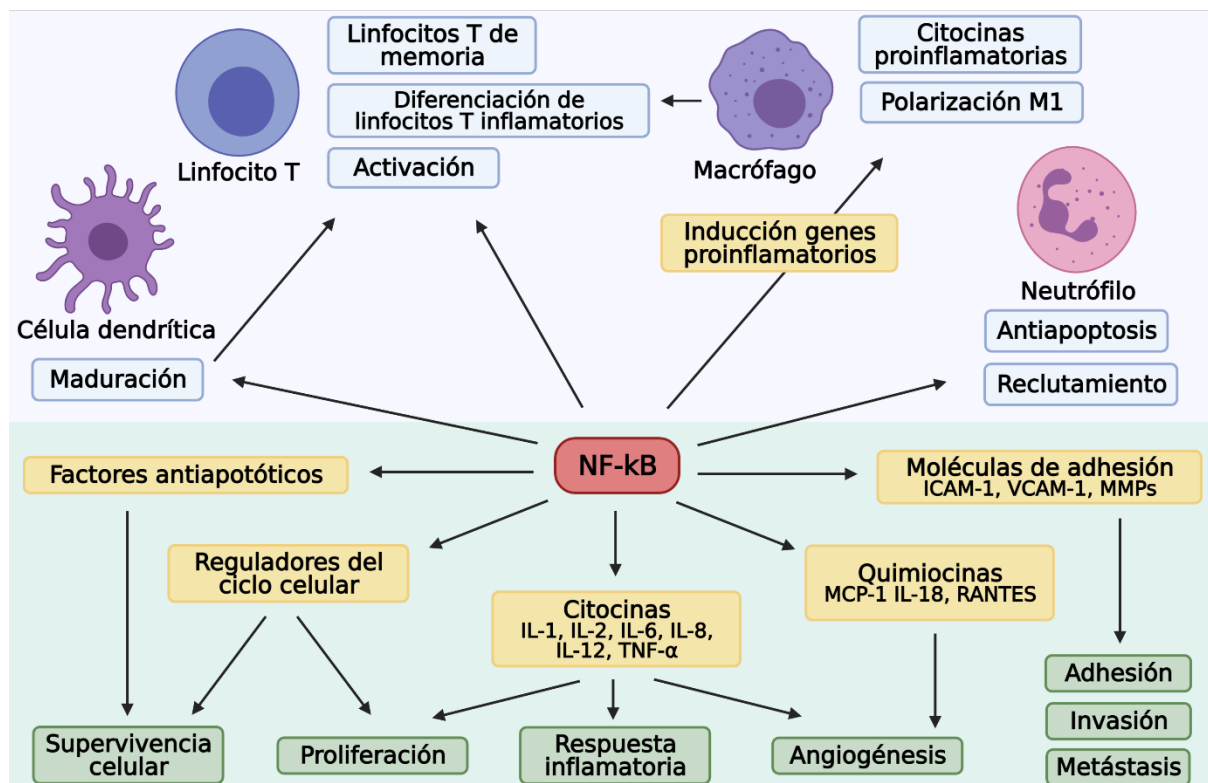


Figura 5. NF- κ B en el desarrollo y progresión de la inflamación. NF- κ B es un factor de transcripción, después de su activación puede promover la transcripción de genes implicados en la inflamación. NF- κ B modula la inflamación tanto de forma directa, aumentando la producción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión, como de forma indirecta, regulando la proliferación, apoptosis, angiogénesis y la diferenciación celular. ICAM-1, molécula de adhesión intercelular 1; IL, interleucina; MCP-1, molécula quimioatrayente de monocitos 1; MMPs, metaloproteinasas de matriz; VCAM-1, molécula de adhesión vascular 1; TNF, factor de necrosis tumoral

El **factor nuclear de células T (NFAT)** es otro factor de transcripción implicado en la inflamación. La familia de NFAT está formada por cinco miembros: NFAT1, NFAT2, NFAT3, NFAT4 y NFAT5, de los cuales todos, menos el NFAT5 que se activa en respuesta al estrés osmótico, están regulados por señalización de calcio⁸⁴. NFAT1-4 están reguladas por el calcio y por la enzima calcineurina o serina-treonina proteína fosfatasa dependiente de calcio/calmodulina. En las células en reposo, el dominio regulador se encuentra fosforilado, manteniendo NFAT en estado inactivado en el citoplasma. Un incremento de los niveles de calcio intracelulares activa la calcineurina, que desfosforila al dominio regulador, dejando expuesta la señal de localización nuclear NFAT1-4 e induciendo su translocación al núcleo. Una vez en el núcleo, las proteínas NFAT son transcripcionalmente activas, se unen a sus dianas en el ADN y regulan la expresión de genes específicos, solas o en consonancia con otras proteínas asociadas nucleares (figura 5)⁸⁵. Diferentes proteínas NFAT pueden regularse mediante quinasas. Por ejemplo, las MAPK c-Jun N-terminal (JNK del inglés, *c-Jun N-terminal Kinase*) y la p38 son quinasas inducibles que promueven la exportación nuclear de NFAT⁸⁶.

El factor de transcripción activador de proteína 1 (AP-1 del inglés, *activated protein 1*) es un compañero transcripcional de NFAT. Clásicamente, AP-1 consta de heterodímeros de proteínas de la familia Fos y Jun. Debido a que la actividad de AP-1 también está regulada por diversas entradas de señalización, la transcripción dependiente de NFAT/AP-1 integra un gran número de vías y procesos de señalización⁸⁷. Las proteínas NFAT1-4 forman fuertes complejos en el ADN con los dímeros Jun y Fos de AP-1. Este complejo ternario NFAT/Jun/Fos sirve como señal integradora para dos vías de señalización diferentes, la vía calcio/calcineurina que activa al NFAT y la vía MAPK que promueve la síntesis y activación de las proteínas de la familia Fos y Jun⁸⁸. Además de la interacción con la familia AP-1, el NFAT puede interaccionar con numerosas familias de factores de transcripción.

Las cascadas de señalización de MAPKs es un mecanismo común de transducción de señales en numerosos procesos celulares. Estas proteínas trabajan de forma coordinada para transmitir señales extracelulares, las cuáles regulan diferentes funciones biológicas, incluyendo la proliferación, diferenciación y desarrollo celular, y también la respuesta al estrés y la apoptosis⁸⁹. Hasta el momento se han descrito cuatro vías diferentes de cascadas MAPK: las quinasas 1 y 2 reguladas por señales extracelulares (ERK1/2, del inglés, *Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2*); la JNK y la MAPK p-38^{89, 90}. La vía MAPK además de ser activada a través del TCR en los linfocitos T, también puede ser activada por numerosos estímulos como los mitógenos, factores de crecimiento y citocinas^{89, 90}.

El **factor nuclear Nrf2** es un factor de transcripción que regula la expresión de genes involucrados en el metabolismo, la respuesta inmune, proliferación celular y otros procesos. Además, este factor de transcripción es sensible al estrés oxidativo y está implicado en la regulación de la respuesta inmune, promoviendo la síntesis de genes antioxidantes y antiinflamatorios. Nrf2 es responsable de la expresión de los genes regulados por el elemento de respuesta antioxidante (ARE, del inglés, *antioxidant response element*). ARE es un elemento regulador transcripcional implicado en la activación de genes que codifican una serie de proteínas y enzimas desintoxicantes y genes antioxidantes que protegen a la célula de diversas agresiones, ya que mantienen la homeostasis al regular el estrés oxidativo e inhibir la progresión de la inflamación⁹¹. Además, la expresión de los genes antioxidantes y antiinflamatorios mediados por Nrf2 pueden cambiar del fenotipo M1 proinflamatorio de los macrófagos o células de la glía hacia el M2 antiinflamatorio⁹².

En condiciones normales, como muestra la figura 6, Nrf2 está unido en el citoplasma a la proteína Keap1 que es un inhibidor endógeno de Nrf2. La interacción entre Keap1 y Nrf2 da lugar a la ubiquitinación de Nrf2 y su degradación en el proteasoma, dando lugar a niveles bajos de Nrf2 en el citoplasma e impidiendo su translocación al núcleo⁹³. Los estímulos oxidativos inducen la activación de la vía Nrf2 a través de mecanismos clásicos. En esta vía los residuos de cisteína de Keap1 sufren oxidación o alquilación que da lugar a la disociación de Nrf2 de Keap1. Por otro lado, la activación de Nrf2 alternativa se da bajo la influencia de determinadas proteínas como p62, una proteína de la familia NF-κB, que dan lugar a la estabilización de Nrf2 en el citoplasma⁹⁴. Tanto la activación clásica como alternativa resulta en la reducción de la ubiquitinación de Nrf2 y por lo tanto de su degradación. Una vez que Nrf2 se separa de Keap1, se fosforila y se transloca al núcleo, donde forma dímeros con proteínas, como las Maf. Este

complejo resultante se une a ARE y desencadena la transcripción de genes del sistema de defensa antioxidante.

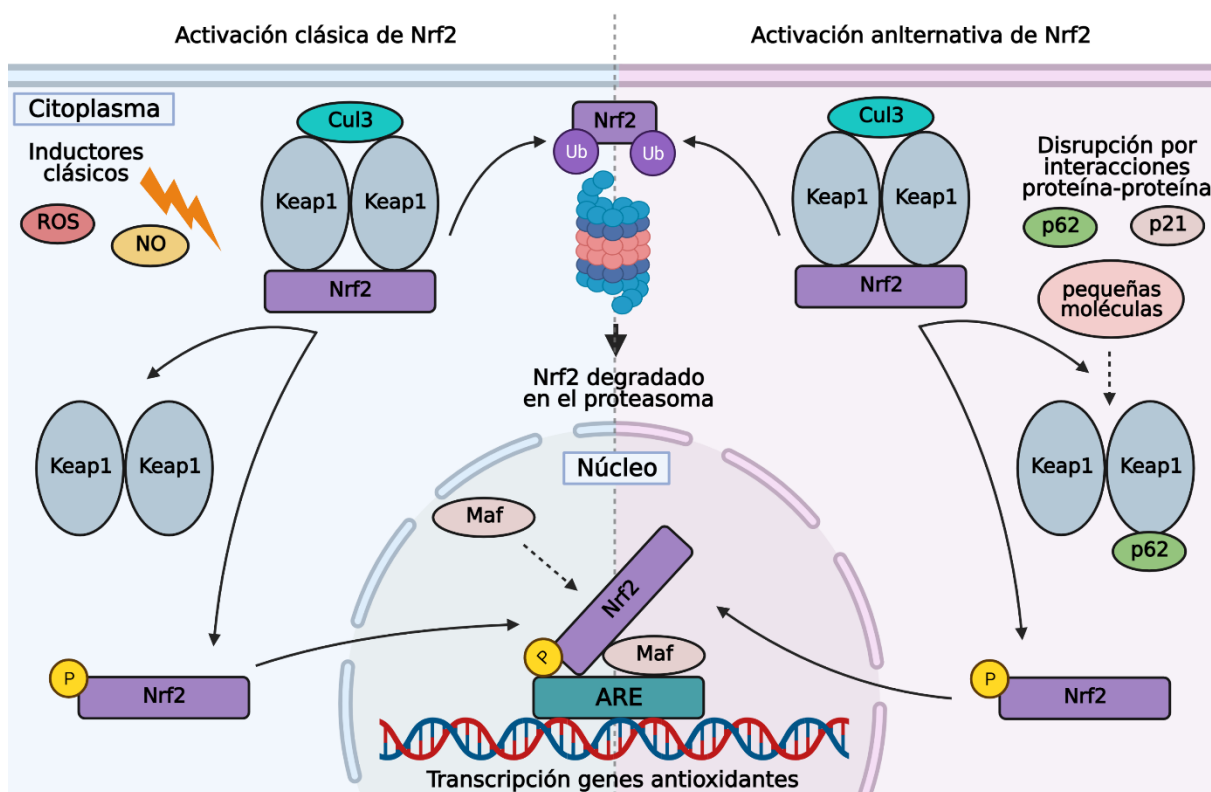


Figura 6. Activación clásica y alternativa de Nrf2. En condiciones normales Nrf2 está unido a Keap1 en el citosol. Keap1 en asociación con Cul3 inducen la ubiquitinación y la degradación de Nrf2 en el proteasoma. En la activación clásica, en condiciones de estrés oxidativo o en presencia de compuestos electrofílicos, Nrf2 se disocia de Keap1. En la activación alternativa, pequeñas proteínas desestabilizan las uniones entre Keap1 y Nrf2 al unirse a uno de los anteriores y disminuye la ubiquitinación de Nrf2. De esta forma, mediante ambas vías, se incrementa la translocación al núcleo de Nrf2, donde se dimeriza con proteínas Maf. El complejo Nrf2/Maf se une y activa ARE, desencadenando la transcripción de genes antiinflamatorios y antioxidantes. ARE, elemento de respuesta antioxidante; Cul3, complejo ligasa E3 basado en Cullin 3; Keap1, proteína 1 asociada a ECH parecida a Kelch; Nrf2, factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2; NO, óxido nítrico; ROS, especies reactivas de oxígeno

Por lo tanto, Nrf2 y NF- κ B mantienen la homeostasis celular, el estado redox y la respuesta frente al estrés y la inflamación. La interacción entre estas vías se produce a través de interacciones complejas que dependen del tipo de célula y tejido⁹⁵. El factor de transcripción NF- κ B influye en la vía de señalización Keap1/Nrf2/ARE mayormente en tres aspectos. Primeramente, Keap1 inhibe la actividad de NF- κ B al degradar I κ B β a través de la adición de moléculas de ubiquitina. Por otro lado, en los procesos inflamatorios se inducen mediadores inflamatorios como la COX-2, que reacciona con Keap1. Esto, da lugar a la activación de Nrf2 y la transcripción génica que, a su vez, inhibe la actividad de NF- κ B. Por último, NF- κ B puede unirse a competidores de Nrf2, dando lugar a la translocación al núcleo de Nrf2. Los miembros de las vías NF- κ B y Nrf2 pueden activarse o inhibirse tanto indirecta, como directamente entre sí^{96, 97}. Es decir, la deficiencia de Nrf2 activa las vías de NF- κ B y viceversa.

Nrf2 juega un papel clave como agente protector en numerosas enfermedades crónicas con base inflamatoria. Además, en los últimos años los activadores de Nrf2, o inhibidores de NF- κ B, se han convertido en una estrategia terapéutica potencial, ya que los agentes antiinflamatorios y antioxidantes dependientes de Nrf2 son importantes para la resolución de la inflamación y sus consecuencias⁹⁸.

1.1.2.5. Receptor linfocitos T (TRC)

La activación y regulación de los linfocitos T, está mediada por una cascada de eventos de señalización interna en la que participan un gran número de proteínas, que dan lugar a la activación celular, con la consiguiente liberación de citocinas y otros mediadores inflamatorios. Esta activación empieza en los TCR, figura 7, cuando un péptido unido al CMH se une al TCR y da como resultado una sinapsis inmune entre las células T y las APCs⁹⁹. El sitio de unión del péptido en el TCR está conformado por un heterodímero, que integra una cadena α y otra β . Las cadenas α y β citoplasmáticas, TCR $\alpha\beta$, carecen de propiedades para transducir señales, ya que no tienen sitios de fosforilación, pero se unen de forma no covalente a múltiples subunidades, que tienen capacidad de transducir señales intracelulares, incluyendo el antígeno de diferenciación (CD, del inglés, *Cluster of Differentiation*) 3 γ , CD3 ϵ y CD3 δ , y en la mayoría de los casos también a un homodímero CD3 ζ . La unión de los linfocitos a las APCs también da lugar a la participación de receptores coestimuladores, como el CD28, que se encarga de reclutar los coreceptores CD8 o CD4, que se unen a su vez a regiones del CMH de clase I o II, respectivamente. Los dominios intracelulares CD4 o CD8 se unen a la proteína tirosina quinasa específicas de linfocitos o LCK, que fosforila a ITAM (del inglés, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) presentes en los dominios citoplasmáticos CD3¹⁰⁰. Cuando se fosforila ITAM deja un sitio de unión a otras proteínas lo que permite la transmisión y amplificación de la señal en el citoplasma¹⁰¹. De esta manera, se producen una serie de fosforilaciones y el reclutamiento de proteínas que dan lugar a cambios en el citoesqueleto y la producción de segundos mensajeros. Estos segundos mensajeros desencadenan un aumento del calcio intracelular y la activación de varias cascadas de señalización, incluidas las MAPKs y la calcineurina³³. Estas vías de señalización son importantes en la modulación de la transcripción de genes efectores en linfocitos T, que dan como resultado la transcripción al núcleo del NF- κ B, el NFAT, el activador de proteína 1 (PA-1, del inglés, *activated protein 1*) Fos, Jun o Rel. Todo esto junto con las señales activadas por los receptores de citocinas orquestan una respuesta múltiple en los linfocitos T, incluyendo la proliferación, migración, producción de citocinas y distintas funciones efectoras^{33, 100}.

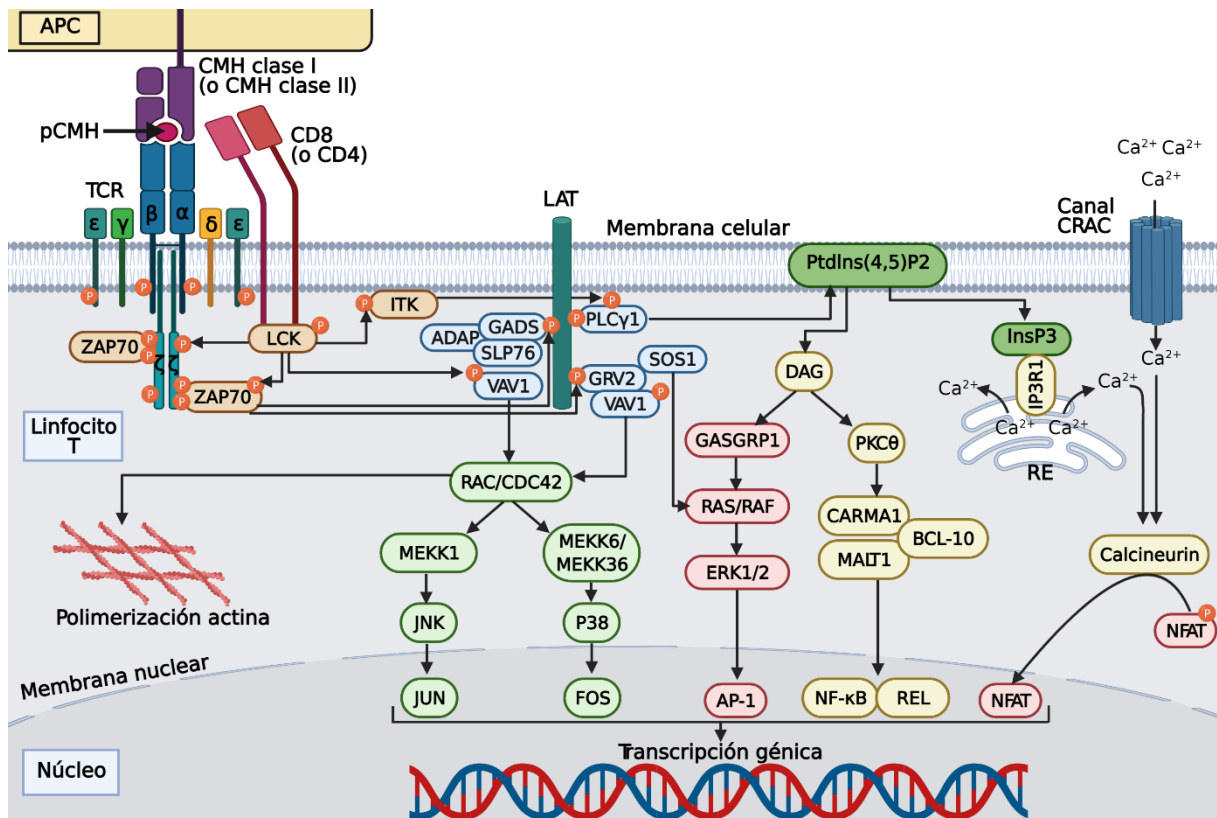


Figura 7. Unión del complejo TCR y pCMH. La unión del TCR y el péptido unido al CMH, expresado en la superficie de una APC, desencadena señales de transducción. La tirosina quinasa LCK se une al dominio citoplasmático de los coreceptores CD4 o CD8 y es captado al TCR por el CMH clase I o II. LCK fosforila a ITAM en las cadenas CD3, donde se unen las tirosinas cinasas ZAP70. ZAP70 fosforila LAT, dando lugar a la formación del signalosoma LAT. La activación de las moléculas asociadas a LAT resulta en la propagación de señales a través de varias rutas de señalización: Ca^{2+} -calcineurina, MAPK y NF- κ B. La activación de estas vías de señalización da lugar a la translocación al núcleo de factores de transcripción como el NFAT, NF- κ B, REL, FOS, JUN y AP-1. Estos factores de transcripción inducen la transcripción de genes implicados en la respuesta inmune, resultando en la proliferación, migración, producción de citocinas y funciones efectoras en los linfocitos T. AP-1, activador de proteína 1; GADS, proteína adaptadora relacionada con GRB2; GRB2, proteína 2 unida a factores de crecimiento; LAT, estabilizador de células T activadas; MAPK, proteínas quinasa activadas por mitógenos; NF- κ B, factor nuclear κ B; NFAT, factor nuclear de células T activadas; pCMH, péptido unido al complejo mayor de histocompatibilidad; TCR, receptor de linfocitos T

1.1.2.6. Receptores tipo toll

Los TLR son una familia de proteínas transmembrana tipo I. Todos sus miembros están relacionados con la respuesta inflamatoria y la progresión de ciertas enfermedades inflamatorias como la aterosclerosis. Estos receptores pertenecen a la familia de los PRRs, al reconocer la presencia de microorganismos. Para ello, son capaces de reconocer estructuras bien conservadas de entre las especies microbianas, que se denominan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS, del inglés, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) o un conjunto de moléculas, que pueden ser citocinas, denominadas patrones moleculares asociadas al daño¹⁰². Los TCRs están formados por tres dominios: el dominio ectópico que es rico en leucina, la región transmembrana y un dominio citosólico. En los humanos hay 10 tipos diferentes de TLRs funcionales¹⁰³. Estos receptores están expresados en células del sistema inmune como macrófagos, células dendríticas y linfocitos, y también en otros tipos celulares, como las endoteliales y epiteliales. Los TCR se encuentran distribuidos por la superficie e

interior celular, ofreciendo así una respuesta inmunológica integral. Los TCR que se encuentran en la superficie celular detectan componentes de la superficie celular microbiana, como el TLR4 que detecta al LPS, o los TLR1, 2 y 6 que detectan lipoproteínas bacterianas¹⁰⁴. Otros que se encuentran en los endosomas, como el TLR3, detectan ácidos nucleicos, por ejemplo, de los virus. En todos ellos ocurren interacciones PAMPS/PRR que dan lugar a la transcripción de genes involucrados en la respuesta inflamatoria. Después de la activación del TLR ocurre su dimerización que induce cambios conformacionales en el dominio citosólico, lo que permite interacciones homotípicas con otros receptores desencadenando una serie de cascadas de señalización. Éstas dan lugar a la translocación desde el citoplasma al núcleo de diferentes factores de transcripción, siendo el más común en la respuesta inflamatoria el NF- κ B. También se pueden activar la cascada de las MAPK, responsable de la translocación de AP-1¹⁰⁵. Esto puede desencadenar la liberación de péptidos antimicrobianos, ILs proinflamatorias, quimiocinas y ROS. La activación de los TCR también da lugar a la inducción de respuestas celulares como la fagocitosis. Además, la desregulación de las vías del TLR pueden dar lugar a la producción desmesurada de IL-1 β , IL-6 y TNF- α ^{106, 107}.

1.1.2.7. Estrés oxidativo

La gran mayoría de los procesos celulares están dirigidos por reacciones que implican transferencia de electrones entre moléculas, cuyo estado redox (balance entre formas reducidas y oxidadas de donantes y aceptores de electrones) se ve modificado¹⁰⁸. La homeostasis redox se mantiene gracias a sistemas amortiguadores redox celulares y extracelulares. A su vez, el equilibrio entre estos sistemas amortiguadores se mantiene mediante enzimas clave, entre las que se encuentran la superóxido dismutasa, la catalasa y las selenoproteínas glutatión peroxidasa y la tioredoxina reductasa, además de los antioxidantes no enzimáticos como el α -tocoferol, el ascorbato, el β -caroteno y los flavonoides¹⁰⁹. El desequilibrio de la homeostasis redox ocurre cuando hay un desequilibrio entre reductores (electrones donantes) y oxidantes (electrones aceptores) dando lugar a un estrés reductivo (el potencial redox se vuelve más negativo) u oxidativo (el potencial redox se vuelve más positivo), siendo este último la forma más común de desequilibrio redox en los sistemas biológicos. Por lo tanto, el estrés oxidativo es el resultado de la generación de especies oxidantes en cantidades que superan las capacidades reductoras celulares, es decir, un desequilibrio entre los oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes (figura 8). Este estado de estrés oxidativo daña el ADN, las proteínas y los lípidos. Las principales familias de oxidantes son las ROS y las RNS¹⁰⁹.

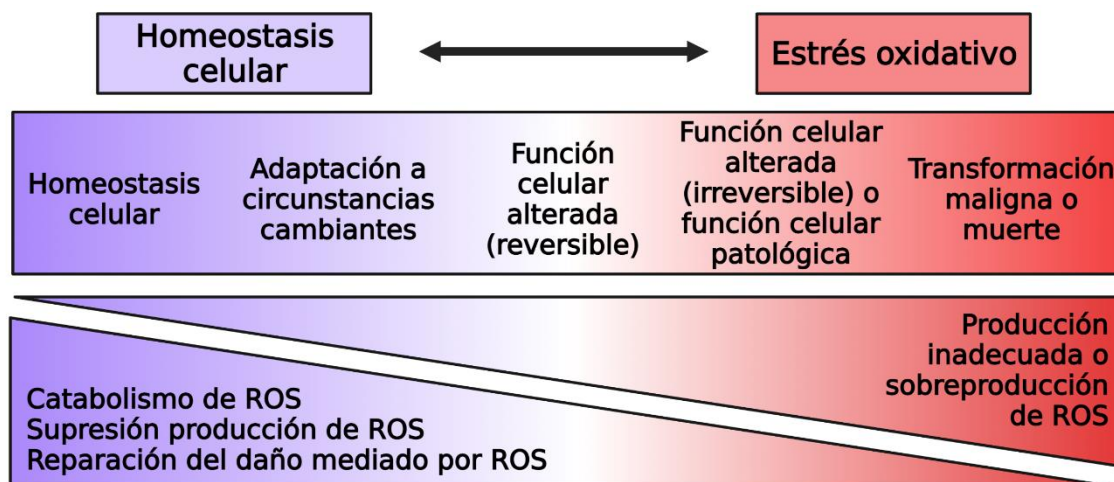


Figura 8. Balance de ROS. Los niveles de ROS están influenciados por su catabolismo y producción y su adaptación. En condiciones normales, la producción y catabolismos de ROS contribuyen a la homeostasis y activación celular fisiológica (lado izquierdo). Cuando hay una excesiva producción de ROS o fallan las vías para suprimir la producción de ROS, las macromoléculas se dañan, dando lugar al llamado “estrés oxidativo”. El daño causado por ROS puede ser reversible mediante la reparación, reemplazo, degradación o secuestro de las macromoléculas dañadas (centro). Sin embargo, si el daño excede la capacidad celular para estas respuestas puede provocar la muerte (lado derecho). ROS, especies reactivas de oxígeno

Las ROS son generalmente producidas por la oxidación de diferentes moléculas, como el O_2 , el ion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo ($\cdot OH$) e ion peróxido (O_2^{2-}), el ácido hipocloroso ($HOCl$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2)¹¹⁰. En las mitocondrias se genera continuamente $O_2^{\cdot-}$, debido a la “fuga” de electrones que se produce en la cadena de transporte de electrones, principalmente en los sitios de unión de la ubiquinona del complejo I y del complejo III, produciéndose la reducción del oxígeno por un electrón. En condiciones fisiológicas, la enzima superóxido dismutasa mitocondrial se encarga de captar $O_2^{\cdot-}$, evitando el daño oxidativo. Sin embargo, en determinadas condiciones patológicas, como la hipoxia o la inflamación, se puede dar una alteración en la transferencia de electrones dentro de la cadena respiratoria mitocondrial, dando lugar al aumento significativo de ROS¹¹¹. Por otro lado, el retículo endoplasmático (RE) también contribuye a la formación de ROS. En condiciones en las que el RE se encuentra bajo estrés, desencadenado por altas concentraciones de glucosa o citocinas inflamatorias, se produce un aumento de la generación de ROS. La formación de $O_2^{\cdot-}$ también depende de varios sistemas enzimáticos, entre los que se encuentran las diversas isoformas de la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NOX). La activación de NOX cataliza la transferencia de electrones del NADPH citosólico al dioxígeno para formar $O_2^{\cdot-}$. La producción de ROS mediada por NOX regula numerosos procesos celulares fisiológicos. Sin embargo, la sobreproducción de ROS y el daño oxidativo mediado por NOX tiene lugar en respuesta a determinados estímulos como la hiperglicemia, factores de crecimiento, diversas hormonas y, sobre todo, en respuesta a citocinas inflamatorias como la IL-1 β y el TNF- α , producidas tanto en la inflamación aguda como crónica. Por otro lado, varios factores de transcripción como STAT1 y NF- κB están implicados en la expresión de los miembros de la familia NOX¹¹⁰.

El NO, es la molécula madre de los RNS y es producida por la enzima NOS, mediante la conversión de l-arginina en l-citrulina. Existen tres isoformas distintas de NOS, la neuronal, la

endotelial y la inducible. En condiciones normales, NO interactúa con metales y otros radicales libres y regula la actividad biológica de numerosas proteínas. Sin embargo, puede convertirse en un potente agente citotóxico, ya que reacciona con O_2^- para producir peroxinitrito, que a su vez es capaz de formar radicales libres secundarios. En condiciones inflamatorias se incrementa notablemente la producción de peroxinitrito debido al incremento simultáneo de NO y O_2^- ¹¹². Además, los NRS pueden alterar la fisiología celular mediante la nitración u oxidación de varios restos celulares. De esta manera, uno de los mecanismos más importantes de la regulación de proteínas por parte de los NRS es la nitración de residuos de tirosina, que es potencialmente perjudicial durante los procesos inflamatorios¹¹³.

Ambos RNS y ROS, inducen daños oxidativos en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, con consecuencias que van desde leves alteraciones en los procesos de transducción de señales hasta daños celulares importantes, que pueden producir la muerte celular. Además, participan en la respuesta inmune e innata y pueden afectar a cualquier paso de estos procesos. Bajo condiciones inflamatorias, se produce un círculo vicioso, el daño oxidativo incrementa la respuesta inflamatoria y esta a su vez la producción de ROS y RNS¹¹⁴.

Por lo tanto, la inflamación es un proceso muy complejo en el que hay muchos mecanismos implicados. Además, como se ha mencionado anteriormente, el fallo en la resolución de la inflamación aguda da lugar a la inflamación crónica. La inflamación crónica está caracterizada por el incremento de las citocinas proinflamatorias en respuesta a estresores ambientales y/o fisiológicos, y hace que el sistema inmunológico esté constantemente en funcionamiento. Esta actividad persistente del sistema inmune es un factor clave en el desarrollo de numerosas enfermedades^{115, 116}. Por otro lado, la inflamación juega un papel importante en enfermedades relacionadas con la edad. El envejecimiento causa numerosos cambios que afectan a la fisiología del cuerpo, entre los que se incluye el sistema inmune, ocasionando mayor susceptibilidad a enfermedades infecciosas y cambios en la homeostasis, que pueden contribuir al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, metabólicas, autoinmunes y/o neurodegenerativas¹¹⁷.

Un ejemplo de enfermedad asociada a la edad y con un componente inflamatorio importante es la aterosclerosis. Esta enfermedad es un proceso inflamatorio crónico de las arterias fomentada por lípidos^{116, 118}. En la evolución de la aterogénesis están involucradas las CEs, los linfocitos, las células del músculo liso y los macrófagos, desde la formación temprana de las células espumosas hasta el desarrollo y consolidación de las placas¹¹⁶. En la figura 9 se muestran las fases de la formación de la placa de ateroma. En la fase temprana de la aterogénesis, el reclutamiento de leucocitos y las citocinas proinflamatorias desempeñan un papel fundamental. En este proceso fisiopatológico se dan numerosos pasos. Primeramente, las células endoteliales se activan por estímulos inflamatorios y pierden su permeabilización a lipoproteínas, las cuales entran en el espacio subendotelial a la vez que aumenta la activación y expresión de los receptores de adhesión. De esta forma, se promueve la migración de los monocitos y leucocitos desde el lumen hacia la íntima. Las quimiocinas y las proteínas quimioatrayentes (como las Cyps y MCP-1) atraen a más células inflamatorias que se adhieren a la íntima gracias a las moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) expresadas en la superficie luminal de las células endoteliales. Los monocitos, cuando están entre la íntima y la media de las arterias, maduran a macrófagos y comienzan a internalizar lipoproteína de baja densidad

(LDL, del inglés, *Low Density Lipoprotein*) creando células espumosas (marcador de la formación del nuevo ateroma). En este momento la aterosclerosis ya está establecida y las células espumosas secretan citocinas proinflamatorias, ROS y otros mediadores que ayudan a aumentar la progresión de la aterosclerosis. En esta etapa, las células espumosas se acumulan en la pared arterial y pueden formar un núcleo necrótico rico en lípidos, típico de las placas de ateroma maduras. De esta manera, la respuesta inflamatoria local se amplifica y la capa fibrosa de la placa se fortalece. Finalmente, la placa de ateroma que está vulnerable se puede fracturar y formar trombos^{119, 120}. Por lo tanto, la inflamación lleva a la formación de la placa de ateroma, que a su vez puede dar lugar a complicaciones, desencadenando la formación de trombos que son los principales causantes del infarto de miocardio, accidentes cerebrovasculares o la muerte cardiovascular¹²¹.



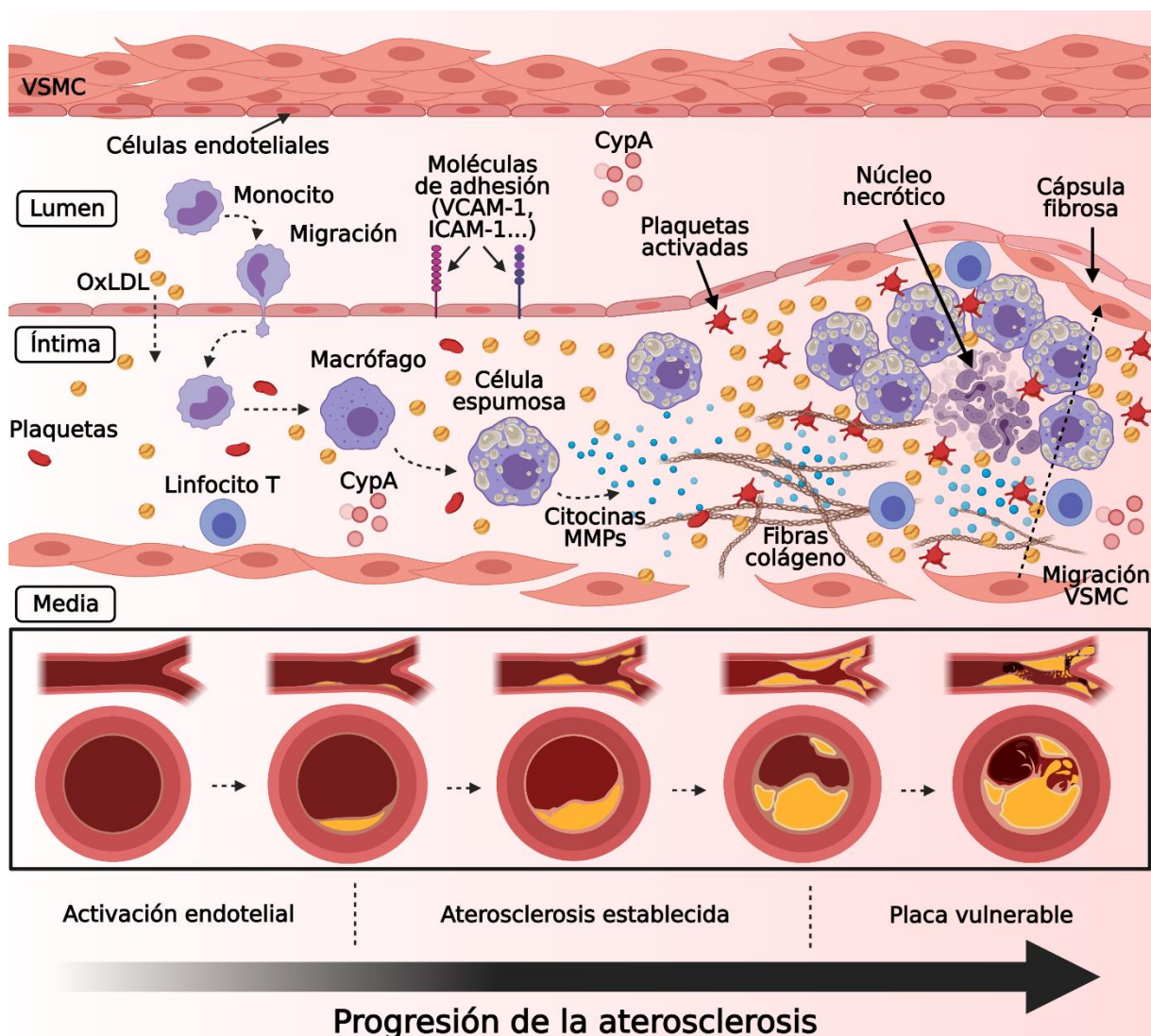


Figura 9. Patogénesis de la aterosclerosis y formación de la placa de ateroma. La activación inicial de las células endoteliales da lugar a la alteración de su permeabilidad y permite la infiltración y acumulación de lípidos. Los monocitos circulantes penetran en la íntima atraídos por las células endoteliales activadas, donde se diferencian a macrófagos, que a su vez internalizan lípidos y forman células espumosas. Las células espumosas van creciendo y se van acumulando en la pared arterial (íntima), donde se fusionan y forman un núcleo necrótico rico en lípidos. En respuesta a la secreción de citocinas proinflamatorias y metaloproteasas, las VSMCs proliferan y migran formando la capa fibrosa de la placa de ateroma. De esta forma el lumen de las arterias (vista longitudinal y transversal de la progresión de la aterosclerosis en las arterias) se va reduciendo y la placa de ateroma se vuelve vulnerable e inestable, pudiendo dar lugar a su ruptura y la formación de trombos. CypA: ciclofilina A; ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1; MMPs, metaloproteinasas; OxLDL, lipoproteína de baja densidad oxidada; VCAM-1: molécula de adhesión vascular 1; VSMCs, células del músculo liso vascular

1.2. CICLOFILINAS

Las ciclofilinas (CyPs) pertenecen a la familia de las peptidil-prolil-*cis/trans*-isomerasas (PPIasas), ubicuamente distribuidas en células eucariotas y procariotas, que se asocian a la patogenia de algunas enfermedades crónicas con base inflamatoria¹²²⁻¹²⁵. Las PPIasas catalizan la isomerización *cis/trans* de los péptidos que poseen residuos de prolina, interviniendo en la actividad y el plegamiento proteico (figura 10)¹²⁵. Las prolinas definen en gran medida la morfología de las proteínas, ya que el anillo de pirrolidina de la proteína es rígido. Sin embargo, la función y conformación de las proteínas pueden ser reguladas por la flexibilidad de los enlaces peptídicos de prolina *cis/trans* y su catálisis por las PPIasas. De esta forma, no sólo modulan la estructura y actividad de las proteínas, sino también sus sitios de unión¹²⁶. La isomerización del enlace *cis/trans* catalizado por estas proteínas es relativamente rápido. Por lo tanto, aumentan la velocidad de los procesos bioquímicos, desempeñando un papel clave en el plegamiento de péptidos emergentes en nuevas proteínas, evitan un plegamiento aberrante (función chaperona), participan en el tráfico y secreción de proteínas y controlan una amplia gama de interacciones entre proteínas^{127, 128}. Estas enzimas están presentes en todas las formas de vida (arqueobacterias, bacterias, plantas, hongos, protista y animales). Asimismo se encuentran en cualquier compartimento de las células eucariotas, incluyendo el citoplasma, retículo endoplasmático, mitocondria y núcleo¹²⁹.

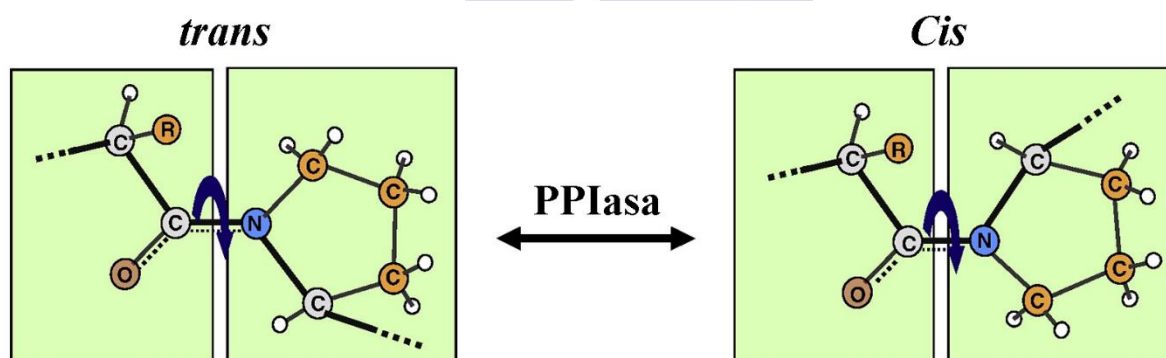


Figura 10. Representación de las formas isoméricas *trans* y *cis* de un enlace peptidil-prolil y la conversión por las PPIasas¹³⁰

Las parvulinas, las proteínas de unión a FKBP (FKBP, del inglés *FK506-Binding Proteins*) y las ciclofilinas (CyPs) son las familias de PPIasas más conocidas¹³¹. Las FKBP y las CyPs se conocen también por el nombre de inmunofilinas por su afinidad a los agentes inmunosupresores, como el FK506 y la rapamicina en el caso de FKBP y la ciclosporina A (CsA) en el caso de las CyPs^{122, 132, 133}. Cada familia de PPIasas tiene dominios catalíticos estructuralmente distintos, por lo que muestran diferencias en la especificidad por los sustratos¹³⁴.

En humanos existen dos parvulinas, la Pin1 (proteína que interactúa con NIMA 1) y Par14/17^{135, 136}. A diferencia de las CyPs y FKBP, las parvulinas no se unen a la CsA, FK506 ni a la rapamicina, por lo que no median ningún efecto inmunosupresor. Sin embargo, la actividad de varias parvulinas puede ser bloqueada por la juglona, un inhibidor no específico¹³⁷. La actividad PPIasa de Pin1 tiene un impacto en diversas proteínas clave relacionadas con numerosos procesos celulares, como la regulación del crecimiento celular, la respuesta inmune, el desarrollo de células germinales y la diferenciación y supervivencia neuronal. De esta forma,

la desregulación de Pin1 está asociada a determinados procesos patológicos, como el cáncer, la enfermedad de Alzheimer, el envejecimiento, el asma e infecciones bacterianas^{138, 139}. Además, ambas parvulinas están directamente relacionadas en procesos de mantenimiento celular como la progresión del ciclo celular, las diferentes vías metabólicas y en la biogénesis ribosomal¹⁴⁰.

Dentro de la familia FKBP el miembro más conocido y estudiado es el FKBP12. Cuando el inmunosupresor FK506 se une al FKBP12 forma un complejo ternario con la calcineurina, inhibiendo su actividad fosfatasa, por lo que se evita la activación del factor de transcripción NFAT y la subsiguiente activación de los linfocitos T^{141, 142}. En el caso de la rapamicina, el complejo FKBP12-rapamicina inhibe a la quinasa mTOR (del inglés *mammalian target of rapamycin*), evitando que los linfocitos T respondan a la estimulación de las citocinas. Ambos fármacos, el FK506 y la rapamicina se usan para evitar el rechazo en pacientes post trasplante y se está empezando a utilizar en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas^{143, 144}.

Las Cyps son proteínas bien conservadas y las primeras en ser investigadas dentro de la familia de las inmunofilinas. Estas proteínas se descubrieron en 1984 en timocitos bovinos y desde se han descrito tanto en plantas como en humanos¹⁴⁵. Primeramente, han sido identificadas por su capacidad de unirse al inmunosupresor CsA y después por su actividad PPIasa. Todas las Cyps poseen un “dominio similar a la Cyp” (CLD, del inglés, *Cyclophilin-Like Domain*). Dependiendo de los módulos funcionales que presentan las Cyps, se pueden dividir en dos clases, las Cyps de dominio único o las de dominio múltiple. Las Cyps de dominio único poseen un solo CLD catalítico con actividad PPIasa. Las Cyps con dominio múltiple, además del CLD poseen otros dominios funcionales¹⁴⁶. Las Cyps están involucradas en procesos celulares importantes, entre los que destacan el plegamiento proteico, la señalización, la regulación transcripcional, la regulación del ciclo celular, la regulación hormonal, la vía de importación vesicular, la mitosis y meiosis y la respuesta al estrés¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Además, las Cyps humanas están relacionadas con varias enfermedades, como la aterosclerosis, diversas enfermedades cardiovasculares, el cáncer, enfermedades neurodegenerativas y la diabetes¹²⁴. Sin embargo, el papel de estas proteínas y su función en la patología de dichas enfermedades aún no está bien definido. En humanos, existen al menos 18 isoenzimas de Cyps codificadas por 17 genes¹⁴⁶. De las cuales 6 se han visto implicadas en enfermedades inflamatorias.

1.2.1. Ciclofilina A (CypA)

La CypA fue la primera PPIasa en ser descubierta y es el miembro de la familia de las inmunofilinas más abundante en humanos¹⁵⁰. Se localiza en el citosol y en el núcleo celular, pero también puede ser liberada al espacio extracelular. La CypA fue identificada como la primera proteína de unión citosólica de la CsA. En mamíferos, el complejo CypA-CsA se une a la calcineurina y la inhibe (figura 11). Cuando se inhibe la calcineurina, se bloquea la translocación del citosol al núcleo del factor de transcripción NFAT y por lo tanto, se previene la transcripción de genes que codifican citoquinas proinflamatorias, la estimulación de la respuesta inmune y la proliferación de los linfocitos T⁸⁴. Es decir, se inhibe la activación de los linfocitos T.

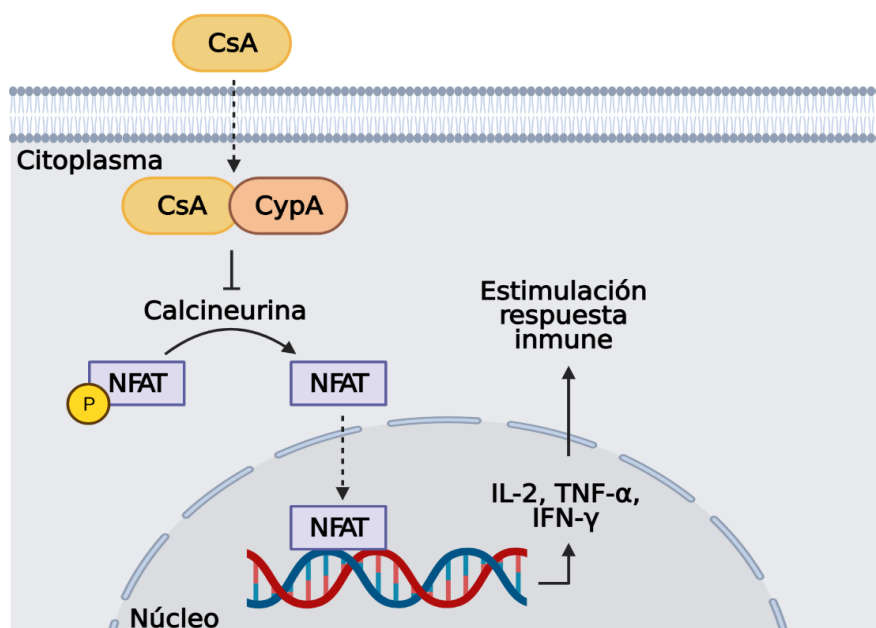


Figura 11. Inhibición de la calcineurina. La CsA se une a la CypA en el citosol, el complejo CsA-CypA se une competitivamente a la calcineurina y la inhibe, por lo que el factor de transcripción NFAT no se puede fosforilar y de esta forma se bloquea su translocación al núcleo donde activaría la transcripción de genes que codifican varias citoquinas, entre ellas la IL-2, el TNF- α y el IFN- γ . De esta forma se impide la respuesta inmune. CsA, ciclosporina A; CypA, ciclofilina A; IFN, interferón; IL, interleucina; NFAT, factor nuclear de células T activadas; TNF, factor de necrosis tumoral

Al principio se creía que la CypA solo tenía funciones intracelulares, ya que se encuentra en grandes cantidades en el citosol y en el núcleo. Esta proteína en el interior celular participa en numerosos procesos celulares como el plegamiento, transporte y función proteica, el crecimiento celular y la oncogénesis¹⁵¹. La CypA aumenta la activación de la angiotensina II en las VSMCs, estimulando la producción de ROS¹⁵². Por otro lado, participa en la inflamación mediante la activación plaquetaria y ayuda a la formación de citoquinas¹⁵³.

En los últimos años se ha demostrado que, en respuesta a estímulos inflamatorios, como la hipoxia, el estrés oxidativo o las infecciones, diferentes tipos celulares, entre los que se incluyen los cardiomiocitos, las VSMCs, las ECs, los macrófagos y los monocitos, liberan CypA al espacio extracelular¹⁵⁴. La CypA puede ser liberada a través de un proceso de formación y transporte de vesículas que se unen a la membrana plasmática y probablemente mediante la activación de su receptor, el CD147. Una vez liberada, la CypA actúa como un factor paracrino y autocrino que media la comunicación entre células. Además de las funciones que ejerce en el interior celular, como proliferación e inflamación, la CypA extracelular también tiene un papel definido en la apoptosis, la migración, la degradación de la matriz y la estimulación de ROS¹⁵². Durante la inflamación aguda, la CypA extracelular ejerce un papel protector, puede atenuar el estrés oxidativo y prevenir la apoptosis, protegiendo a las neuronas y a las VSMCs^{155, 156}. Sin embargo, durante el proceso inflamatorio crónico, la CypA está asociada a numerosas consecuencias dañinas. El principal mecanismo de los efectos patógenos de la CypA extracelular es su actividad quimiotáctica que ejerce sobre numerosos tipos de leucocitos, como los neutrófilos, eosinófilos y los linfocitos T. De esta forma, los leucocitos migran al lugar de inflamación, donde la respuesta inflamatoria se exagera y se extiende contribuyendo a convertir una respuesta inflamatoria aguda en un proceso crónico. Además, la CypA potencia

la actividad de las quimiocinas clásicas al estimular la producción de proteínas proinflamatorias¹⁵⁷. Por otro lado, esta inmunofilina induce la expresión de moléculas de adhesión, como VCAM-1 e ICAM-1, por parte de las CEs, así como su disfunción y apoptosis. La CypA también estimula la proliferación y migración de las VSMCs, los linfocitos T y fibroblastos. De esta manera, se activan las MMPs y se induce la adhesión plaquetaria y de monocitos a la matriz extracelular, lo que puede dar lugar a la formación de trombos y a la hipertrofia cardíaca¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. También se ha visto que, tratando a las células con CypA se activan varias vías como la ERK1/2, el NF- κ B, JNK y p38 MAPK^{122, 161}. Como se mencionó anteriormente, a pesar de que la CypA inicialmente ejerce efectos beneficiosos en la inflamación, destaca por sus efectos perjudiciales durante el proceso inflamatorio crónico¹⁶².

Actualmente aún se desconoce el mecanismo exacto por el cuál la CypA extracelular media funciones proinflamatorias. Las vías de señalización y las funciones inducidas por la CypA extracelular, pueden ser a través de su actividad PPIasa o a través de la unión con el receptor de superficie celular, el CD147¹²². En la tabla 1, se detallan las funciones principales de la CypA extracelular y los posibles receptores de señalización *in vitro*. El CD147 o inductor extracelular de las MMPs extracelulares, es una glicoproteína transmembrana de tipo I, perteneciente a la familia de las superglobulinas y es importante en numerosos procesos fisiológico. Este receptor está altamente glicosilado y reconoce moléculas en las mismas células, sobre todo en la misma membrana (reconocimiento *cis*), y aquellas situadas extracelularmente (reconocimiento *trans*). La forma madura del CD147 está formada por tres dominios, el dominio extracelular, el dominio transmembrana y un dominio corto citoplasmático¹⁶³. Este receptor está expresado en muchos tipos celulares, incluyendo células hematopoyéticas, CEs, queratinocitos y plaquetas. Además, su expresión está aumentada en linfocitos, monocitos, macrófagos y células dendríticas activadas durante la respuesta inmune o inflamatoria^{164, 165}. La CypA se une al receptor CD147 y transmite una cascada de señalización mediante la cual la CypA ejerce sus funciones. Esta unión no es muy fuerte y parece ser de naturaleza transitoria¹⁶⁶. Los eventos de señalización y los mecanismos exactos responsables de la iniciación de la señal CD147 después de la interacción con la CypA extracelular se desconoce. Aunque se ha demostrado que la inmunofilina cataliza la isomerización *cis-trans* del enlace peptídico Trp²⁰¹-Pro²¹¹ del dominio extracelular del CD147, aún no se sabe si isomeriza otros dominios. La unión de la CypA extracelular a la mayoría de las células depende de los proteoglicanos heparán sulfato, además, el tratamiento con heparinasa anula la señalización de esta Cyp¹²². Este requerimiento del heparán sulfato puede ser explicado por una escasa expresión de CD147 y la baja afinidad de la interacción entre CD147/CypA, ya que cuando se aumenta la expresión de CD147 en la superficie de los linfocitos T activados, la heparinasa no anula la señalización de la CypA¹⁶⁷. También se ha hipotetizado la participación de correceptores en la transmisión de la señalización inducida por la CypA¹⁶⁸. La expresión del receptor en la superficie de la membrana plasmática está regulada por la inflamación y también por la modulación de la CypA, ya que el sitio de unión de la CypA ubicado en el dominio transmembrana en el residuo Pro²¹¹ de CD147 es responsable del transporte del receptor a la superficie¹⁶⁹. Por otro lado, se ha demostrado que la estimulación de IL-8 por parte de la CypA extracelular no está mediada por el receptor CD147. Estos estudios sugieren que la CypA puede estar usando un receptor alternativo para actividades específicas en ciertos modelos celulares¹⁷⁰.

Tabla 1. Efectos extracelulares de la CypA y posibles receptores de señalización *in vitro*

EFFECTOS CYPA EXTRACELULAR	RECEPTOR CD147	RECEPTOR DESCONOCIDO
APOPTOSIS (CE)		✓
QUIMIOTAXIS (LEUCOCITOS)	✓	
PRODUCCIÓN IL-8		✓
INFLAMACIÓN (VCMCS, CE, ETC.)	✓	✓
ACTIVACIÓN MMP (MACRÓFAGOS, CÉLULAS GLIALES, ETC.)	✓	
PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN (VSMCS, ETC.)	✓	

La CypA está relacionada con diversas patologías, como las infecciones virales, las enfermedades neurodegenerativas, el cáncer, la sepsis, el asma, la periodontitis, la artritis reumatoide y el envejecimiento¹⁷¹⁻¹⁷³. Además, tanto la CypA intracelular como la extracelular están implicadas en numerosas enfermedades cardiovasculares ya que participa en la remodelación vascular (formación de neoíntima, engrosamiento de las capa media y adventicia). La silenciación de la CypA en modelos animales de enfermedades cardiovasculares reduce la inflamación, el desarrollo de aterosclerosis, la hipertrofia cardíaca, el aneurisma aórtico abdominal, el estrés oxidativo y la degradación de la matriz extracelular^{158, 174, 175}. En las lesiones ateroscleróticas avanzadas se han encontrado niveles altos de CypA, ya que los macrófagos pueden secretar niveles altos de CypA, estimulados por ROS. Por otro lado, la CypA media en la activación y apoptosis inducida por la LDL oxidada en macrófagos¹⁷⁶. También participa en el daño miocárdico por isquemia-reperfusión, al atraer macrófagos y neutrófilos al tejido dañado¹⁷⁷. A través de la regulación del calcio en las plaquetas, promueve la trombosis arterial¹⁷⁸. Puede participar en los procesos de hipertensión, ya que modula la expresión de la NOS endotelial, la cual regula la producción de NO y la presión sanguínea. Por otro lado, se han encontrado altos niveles de CypA prácticamente en todas las enfermedades inflamatorias, así como en el suero de pacientes con hipertensión pulmonar, diabetes, aterosclerosis o la enfermedad de las arterias coronarias (EAC) y en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide. Por este motivo, la CypA ha sido propuesta como marcador de enfermedades como EAC, la hipertensión y la diabetes mellitus¹⁷⁹⁻¹⁸¹.

Hay una clara relación entre la CypA y las enfermedades cardiovasculares (figura 12). Casi todas las enfermedades cardiovasculares se inician después de la activación de las CEs. Las CEs activadas inducen, en las células inflamatorias, la expresión de moléculas de adhesión, la producción de altas cantidades de ROS y la liberación citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento, que promueven la enfermedad cardiovascular. El ambiente oxidante iniciado por la inflamación vascular crea un círculo vicioso que da lugar a la progresión de la inflamación. De esta forma se libera CypA al medio y esta a su vez fomenta la generación de ROS por parte de otras células. La secreción de CypA está regulada por la activación de Rho-quinasa, la cual juega un papel crucial en la inflamación, la contracción vascular y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares^{182, 183}. De esta forma, la CypA es una molécula interesante para estudiar y mejorar el entendimiento de las enfermedades cardiovasculares con base inflamatoria. Además, puede ser una diana y una herramienta útil en el tratamiento de estas patologías.

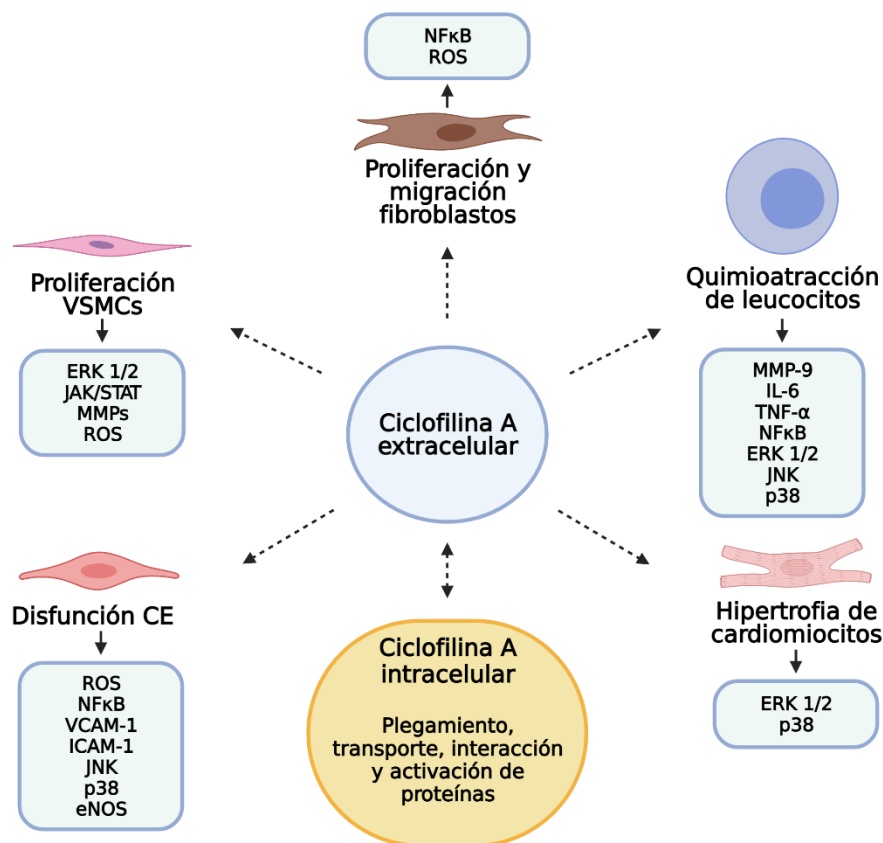


Figura 12. Efectos celulares de la CypA en las enfermedades cardiovasculares. La CypA, mediante la activación de proteínas de señalización, reflejadas en la figura, provoca disfunción de las CEs, incremento de la proliferación de las VSMCs y fibroblastos, actúa como quimioatrayente de leucocitos y estimula la hipertrofia de los cardiomiocitos. Estas funciones también están mediadas por la CypA intracelular y su función en el plegamiento, transporte, interacción y activación de proteínas. CE, célula endotelial; eNOS, la enzima endotelial de óxido nítrico sintasa; ERK1/2, quinasas 1 y 2 reguladas por señales extracelulares; ICAM-1, molécula de adhesión intercelular 1; IFN, interferón; IL, interleucina; JNK, quinasas c-Jun N-terminal; MMPs, metaloproteinasas de matriz; NF-κB, factor nuclear κB; ROS, especies reactivas de oxígeno; TNF, factor de necrosis tumoral; VCAM-1, molécula de adhesión vascular 1; VSMCs, células del músculo liso vascular

1.2.2. Ciclofilina B (CypB)

La CypB está expresada abundantemente en todos los tejidos, aunque a un nivel menor que la CypA. CypB comparte una homología de secuencia del 65% con la CypA, y una homología del 80% con su dominio central, donde contiene la región de unión de PPI y CsA. También comparte con la CypA el receptor CD147 y depende de los proteoglicanos heparán sulfato para su interacción. A pesar de sus similitudes, tienen funciones diferentes, que pueden deberse a diferencias a la hora de interaccionar con el receptor, ya que CypB cataliza la isomerización *cis/trans* del enlace peptídico entre Asp¹⁷⁹-Pro¹⁸⁰ del dominio extracelular de CD147 y no se ha determinado si también cataliza el enlace entre Trp²⁰¹-Pro²¹¹ como hace la CypA¹⁸⁴. Además, otra diferencia entre la CypA y la B es que ésta última posee extensiones N- y C-terminales, que se corresponden con una secuencia de señal del RE y con una señal de retención del RE, respectivamente¹⁸⁵. La CypB se expresa mayormente en el RE, pero también en el aparato de Golgi, en el núcleo, en la membrana plasmática y en el espacio extracelular. Esta Cyp participa en varios procesos celulares, como la regulación transcripcional, la secreción proteica, la respuesta inmune y la apoptosis¹⁸⁶. Además, algunos virus, como el virus de la

inmunodeficiencia humana, necesitan la CypB para poder replicarse¹⁸⁷. Por otro lado, está relacionada con el colágeno, ya que participa en su transporte intracelular y la correcta formación de fibrillas de colágeno. El tratamiento con CsA reduce la actividad PPIasa de la CypB, bloquea la unión del colágeno y aumenta su secreción¹⁸⁸. Asimismo, una reducción de la CypB en el RE puede tener un impacto negativo en el plegamiento y transporte al exterior a través de la vía secretora de proteínas que contienen *cis*-Pro, como la albúmina y la transferrina. Incluso se ha demostrado, que una parte del estrés oxidativo producido por los tratamientos con CsA se debe a la disminución de CypB en el RE¹⁸⁹. Por otro lado, las funciones principales de la CypB están relacionadas con la homeostasis redox del RE, el plegamiento del colágeno, la homeostasis del calcio, la biogénesis del ribosoma y la señalización de la prolactina¹⁸⁹⁻¹⁹¹. Del mismo modo que la CypA, la CypB también presenta una doble cara en el proceso inflamatorio, ya que puede proteger frente a ROS en la inflamación aguda, pero también participa en el proceso inflamatorio crónico^{192, 193}. La CypB se excreta bajo estímulos inflamatorios y el estrés oxidativo, como ocurre con la CypA. Extracelularmente, la CypB, induce la quimiotaxis de las células inflamatorias hacia los tejidos dañados, sin embargo, a diferencia de la CypA, la CypB promueve la adhesión de linfocitos T de memoria a la matriz extracelular. Por otro lado, la CypB juega un papel importante en la regulación del proceso inflamatorio, ya que se han encontrado niveles altos de esta inmunofilina en numerosas enfermedades con base inflamatoria^{168, 190, 193}.

La CypB extracelular puede iniciar y/o agravar la respuesta inflamatoria, sobre todo a través del reclutamiento de leucocitos y la estimulación de la producción de MMPs. Además, la participación de la CypB en las enfermedades cardiovasculares también ha sido demostrada¹⁶⁸. Además, participa en la hipertensión, ya que se han encontrado niveles altos de CypB en los túbulos renales proximales en ratas con hipertensión espontánea, lo que sugiere que interviene en la función anormal del epitelio de transporte renal. Además, la CypB induce la producción de ROS por parte de las VSMCs. Esta producción de ROS mediada por CypB regula las vías de ERK1/2 y sus consecuencias sobre la función vascular^{194, 195}.

1.2.3. Ciclofilina C (CypC)

La CypC es menos abundante que la CypA y la CypB y se distribuye de forma diferente en los tejidos, ya que donde se ha observado una mayor expresión ha sido en el riñón. Se localiza en el RE, el aparato de Golgi y en el espacio extracelular¹⁹⁶. La CypC comparte un 67% de identidad de secuencia y una alta similitud estructural con la CypB. La CsA también se une a la CypC y la inhibe, además de estimular su secreción del mismo modo que ocurre con la CypB, lo que está relacionado con el daño oxidativo¹⁹⁷. La reducción de CypC en el RE también tiene un impacto negativo en el plegamiento y excreción de las proteínas que contienen *cis*-Pro¹⁸⁹. Esta inmunofilina, de la misma manera que CypB, regula la homeostasis redox del RE y la degradación del ADN^{189, 198}. También se ha reportado la unión de la CypC al receptor CD147 en ratones y se ha hipotetizado su unión en humanos^{199, 200}.

La proteína asociada a CypC, es una proteína secretora, que se une a la CypC formando un complejo, el cual también es inhibido por la CsA. Este complejo se ha visto relacionado con la activación de la vía calcineurina/NFAT en macrófagos y microglía, estimulando su supervivencia, su función fagocítica y migración al sitio dañado²⁰¹. Además, la CypC y la proteína asociada a CypC están sobre expresadas, especialmente en la microglía después de una

isquemia focal inducida por la oclusión de la arterial cerebral media²⁰². Por otro lado, la expresión de CypC se ha visto relacionada con otras enfermedades humanas, como el glioma, donde niveles altos de esta proteína se correlacionan con un peor pronóstico de supervivencia²⁰³. Finalmente, se ha descrito un aumento de la expresión de CypC en timocitos sometidos a competencia celular y se ha sugerido su función esencial en el desarrollo y homeostasis de la mayoría de las células del sistema inmune²⁰⁴. Sin embargo, se desconoce las funciones exactas de CypC, así como su relación con las patologías inflamatorias.

1.2.4. Ciclofilina D (CypD)

La CypD juega un papel importante en la biología mitocondrial. Al igual que las Cyps anteriores, también se une a la CsA. Aunque la función fisiológica de la CypD sigue siendo difícil de entender, se ha demostrado que es un componente del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) y que regula su apertura y la homeostasis del calcio asegurando una función metabólica óptima y una activación adecuada de la muerte celular. La apertura de este poro da lugar a una disipación del potencial de membrana mitocondrial, la pérdida de la producción de ATP y posteriormente, la muerte celular (figura 13)²⁰⁵. La CypD interactúa con la F1F10-ATP sintasa, el portador de fosfato y el translocador de nucleótidos de adenina, todos ellos propuestos como potenciales componentes del mPTP²⁰⁶. La apertura irreversible del mPTP está asociada a la muerte celular, su apertura transitoria de corta duración tiene un papel en la regulación del calcio de la matriz, la cual puede regular la energía mitocondrial²⁰⁷. Por lo tanto, la CypD como parte del poro mitocondrial puede regular esta bioenergética mitocondrial.

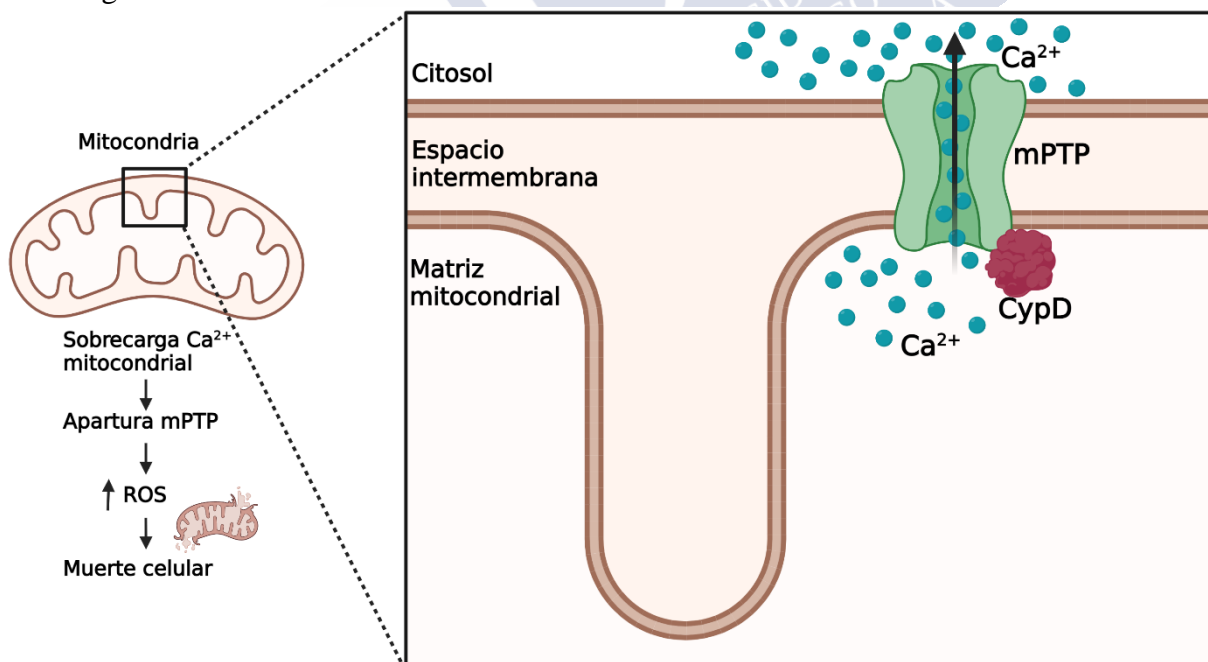


Figura 13. Apertura poro mitocondrial. Ejemplo de apertura del poro mitocondrial, en este caso por sobrecarga de calcio intracelular, que lleva a una disipación del potencial de membrana mitocondrial, aumento de ROS, pérdida de la producción de ATP que da lugar a la apertura permanente del mPTP y finalmente, la muerte celular. CypD: ciclofilina D; mPTP: poro de transición de permeabilidad mitocondrial; ROS: especies reactivas de oxígeno

A través de la fosforilación oxidativa, la mitocondria produce energía en forma de ATP. La cadena de transporte de electrones (complejos I-IV) utiliza electrones procedentes de la oxidación de ácidos grasos, la glucólisis y el ciclo de Krebs para transferirlos al oxígeno y bombear protones desde la matriz al espacio intermembrana, así se forma un gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna. La ATP sintasa aprovecha este gradiente para crear ATP a partir del ADP y fosfato inorgánico. El translocador de nucleótidos de adenina transporta el ATP desde la matriz mitocondrial al citosol para que la célula pueda usarlo. Para aumentar la eficacia de la formación de ATP y su translocación al citosol, la ATP sintasa puede oligomerizar con el portador de fosfato y el translocador de nucleótidos de adenina, formando un sintasoma cuyo ensamblaje está regulado por la CypD. La apertura del mPTP disipa el gradiente de protones y desacopla el transporte de electrones de la producción de ATP²⁰⁸. La CypD es un regulador del mPTP y, por lo tanto, del acoplamiento mitocondrial. Por otro lado, la CypD se puede unir a la ATP sintetasa y reducir la formación de ATP, mientras que la CsA la desplaza de la membrana interna mitocondrial y aumenta la síntesis de ATP²⁰⁹. En las mitocondrias del corazón, del cerebro y del hígado, la CypD también estimula el ensamblaje de sintasomas²⁰⁸. Además, la CypD puede regular la expresión de genes mitocondriales y modular la activación de mediadores inflamatorios, afectando a la proliferación y a la motilidad celular²¹⁰. Por otro lado, la actividad PPIasa de la CypD puede tener un papel regulador en el mPTP, facilitando la activación del mPTP, sin embargo, se desconoce el mecanismo exacto por el cuál ocurre²¹¹.

El mPTP y por lo tanto la CypD, están implicados en el daño por isquemia/reperfusión en el corazón, cerebro y riñón, con las enfermedades neurodegenerativas, la esclerosis múltiple, el envejecimiento y la distrofia muscular²¹²⁻²¹⁶. La silenciación de la CypD confiere neuroprotección, mejora el aprendizaje y preserva la integridad axonal en modelos de enfermedades neurodegenerativas con base inflamatoria, como la enfermedad de Alzheimer o la esclerosis múltiple^{216, 217}.

La mitocondria sirve como orgánulo centinela, que detecta daños celulares y también es capaz de orquestar una respuesta inflamatoria. De esta forma, en respuesta a alteraciones de la homeostasis celular durante una infección, daños o alteraciones metabólicas, las mitocondrias aumentan la producción de ROS. Este ROS mitocondrial sirve como molécula de señalización y transmiten estas señales de agresión al resto de la célula mediante la activación de factores de transcripción inflamatorios, la apoptosis o la autofagia²¹⁸. La inflamación y el estrés oxidativo están estrechamente relacionados con las enfermedades cardiovasculares, y la CypD media en el estrés oxidativo a través del mPTP. Se ha demostrado el papel del ROS mitocondrial en la patología inflamatoria de las enfermedades cardiovasculares. Por ejemplo, en la inflamación crónica de bajo grado, el ROS mitocondrial activa el factor de transcripción NF-κB proinflamatorio, el cual está muy relacionado con la inflamación y las patologías vasculares²¹⁹. En numerosos estudios *in vitro* de isquemia/reperfusión, se ha visto que el bloqueo del gen de la CypD proporciona protección frente al daño en el riñón, corazón y cerebro^{211, 220}. El mPTP es crítico en la muerte de los cardiomiocitos durante la reperfusión después de un proceso isquémico, además, algunos factores como la duración de la isquemia y la edad empeoran el pronóstico^{221, 222}. Asimismo, el tratamiento de cardiomiocitos con CsA los protege de los daños inducidos por isquemia/reperfusión²²³. También se ha descrito que, en modelos de fallo cardíaco, la supresión de CypD disminuye el tamaño de infarto, mejorando la función cardíaca

después del infarto²²⁴. Por el contrario, también se han observado efectos negativos y una disminución de la cardioprotección cuando se bloquea el gen de la CypD en animales sometidos a precondicionamiento isquémico o sometidos a una sobrepresión para inducir fallo cardíaco. Sorprendentemente, el ejercicio físico en ratones con la CypD bloqueada, empeora la hipertrofia cardíaca. Esto es debido a una alteración en el flujo de calcio mediado por el mPTP y el acúmulo del calcio en el interior de la matriz mitocondrial²²⁵. Por lo tanto, la CypD participa claramente en la inflamación crónica y en numerosas enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, seguramente por su papel en la regulación del mPTP. Sin embargo, se desconocen los mecanismos exactos por los cuales media estos procesos.

1.2.5. Otras ciclofilinas (Cyphs)

La CypJ, comparte un 50% de su identidad de secuencia con la CypA. Aunque las funciones biológicas de esta proteína se desconocen, se ha demostrado que la CypJ está implicada en el desarrollo y progresión del cáncer^{226, 227}. Por otro lado, bajo estímulos inflamatorios la CypJ está sobreexpresada y participa en la regulación de la vía del factor de transcripción NF- κ B²²⁸. Además, la actividad de esta inmunofilina está relacionada con el desarrollo y las funciones cardíacas^{125, 229}.

La Cyp40 se encuentra mayormente en el núcleo, aunque también se puede encontrar en el citoplasma. Esta proteína participa en el plegamiento proteico, en la unión de ligandos y en la señalización de receptor de glucocorticoides, estrógenos y progesterona^{230, 231}. El estrés celular aumenta la actividad chaperona e isomerasa de la Cyp40 y tanto su regulación positiva como negativa pueden tener efectos pro tumorgénicos²³². También se han demostrado sus efectos beneficiosos desagregando amiloides neurodegenerativos, como tau²³³. Por otro lado, como ocurre con la CypJ, la Cyp40 está implicada en el desarrollo del corazón y funciones cardíacas^{125, 229}.

1.2.6. Modulación farmacológica de las Cyphs

Las Cyphs están vinculadas con numerosas enfermedades relacionadas con la inflamación y su modulación con compuestos específicos puede ser una herramienta interesante en el tratamiento de estas patologías. Por otro lado, la modulación de estas proteínas también es interesante para entender mejor sus mecanismos de acción y poder comprender la relación de estas patologías y la implicación de las Cyphs. Sin embargo, el único compuesto conocido que modula las Cyphs es la ciclosporina A y sus análogos, pero su uso está reducido ya que es nefro y hepatotóxico^{122, 234, 235}. Por esta razón, es útil la búsqueda de nuevos compuestos líderes capaces de modular la inflamación. En este sentido, los compuestos de origen marino son una fuente novedosa de nuevos compuestos bioactivos²³⁶⁻²³⁹.

1.3. COMPUESTOS DE ORIGEN MARINO CON ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA

Desde la antigüedad, la mayoría de los compuestos con actividad farmacológica procedían del medio terrestre. Sin embargo, en los últimos años, los ecosistemas marinos, debido a su enorme biodiversidad, se han convertido en una fuente constante de nuevas moléculas con interesantes actividades biológicas²⁴⁰. Se estima que entre un 50 y un 80% de la vida en la Tierra está debajo de la superficie del océano, sin embargo, menos del 10% de este espacio ha sido explorado. Según el registro mundial de especies marinas, sobre 240.000 especies marinas han sido identificadas hoy en día, de las cuales 2.554 se han registrado el pasado año 2020²⁴¹. Gracias a esta gran diversidad y al gran número de especies que quedan por descubrir, los organismos marinos son una prometedora fuente de nuevos compuestos bioactivos²⁴². Los océanos contienen hábitats diversos, con diferentes temperaturas, presiones hidrostáticas y niveles de salinidad. Para sobrevivir a los ecosistemas y a posibles depredadores, los organismos marinos han desarrollado diferentes mecanismos de adaptación, como la producción de biomoléculas específicas, metabolitos secundarios. Este potencial para producir compuestos bioactivos por parte de los organismos marinos no se encuentra en ambientes terrestres. En concreto, los hábitats marinos extremos son nichos ecológicos exclusivos donde los organismos extremófilos producen compuestos únicos, al desarrollar vías y características bioquímicas singulares²⁴³.

Desde que se descubrió el primer compuesto bioactivo de origen marino, la cefalosporina C, en 1949 hasta la década de los 80, la tasa de descubrimiento de metabolitos activos fue muy lenta. Sin embargo, desde el 1985 se han identificado más de 15.000 nuevos metabolitos de origen marino, muchos de los cuales muestran actividades interesantes²³⁷. Entre estas actividades destacan la actividad antiinflamatoria, anticancerígena, inmunosupresora, antibacteriana, antioxidante, antihipertensiva y antidiabética^{244, 245}. Por este motivo, en los últimos años la industria farmacéutica se están centrando en los metabolitos bioactivos derivados de microorganismos marinos²⁴⁶. Estos prometedores compuestos con actividades terapéuticas han sido aislados tanto de microorganismos como de macroorganismos, entre los que destacan bacterias, hongos, cianobacterias, dinoflagelados, esponjas, cnidarios, tunicados y moluscos^{245, 247}.

1.3.1. Compuestos aislados a partir de bacterias

Las bacterias pueden encontrarse en casi cualquier ecosistema, desde ambientes terrestres hasta marinos, y soportan condiciones extremas como altas temperaturas o alta salinidad. Las bacterias pueden vivir simbiótica y parasitariamente, por lo que es frecuente encontrarlas en simbiosis con otros organismos marinos como cnidarios, esponjas y tunicados²⁴⁸. Se cree que las bacterias aisladas de ecosistemas marinos tienen propiedades bioquímicas, fisiológicas y moleculares diferentes a las bacterias terrestres, por lo que pueden producir diferentes tipos de metabolitos²⁴⁹. Las principales bacterias de agua de mar son *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp., *Achromobacter* sp., *Flavobacterium* sp. y *Micrococcus* sp. Sin embargo, de todos los metabolitos bioactivos que producen los microorganismos, más del 40% están producidos por los géneros *Streptomyces* y *Micromonospora*, del Filo Actinobacteria. Alrededor del 50% de los antibióticos microbianos son derivados de estas bacterias²⁵⁰. A pesar de que la gran mayoría de los metabolitos bioactivos provienen de actinobacterias terrestres, en las últimas décadas se han aislado productos naturales bioactivos de actinobacterias marinas²⁵¹. Un ejemplo de

compuesto bioactivo es la salinosporamida A (también conocido como marizomib o NPI-0052), aislado de las bacterias marinas *Salinispora tropica* y *Salinispora arenicola*²⁵². La salinosporamida A es una β -lactona- γ -lactámica que actúa inhibiendo el proteasoma 20S y actualmente se encuentra en ensayos clínicos de fase III en pacientes con glioblastoma y mieloma múltiple por su actividad antitumoral²³⁸.

Streptomyces es el género más extenso del filo *Actinobacteria*, formado por un conjunto de bacterias filamentosas Gram positivo. Están presentes en casi todos los ambientes, desde el mar profundo hasta las altas montañas y pueden vivir solos o en simbiosis con organismos multicelulares, como esponjas o corales²⁵³. Este grupo de bacterias son inmóviles, producen hifas filiformes que penetran en la superficie buscando nutrientes. Cuando los recursos son limitados o las condiciones adversas, forman hifas aéreas que producen esporas resistentes que se disipan a nuevos ambientes o fuentes de alimentación²⁵⁴. Durante la fase de crecimiento, *Streptomyces* produce numerosos metabolitos secundarios. Estos metabolitos ayudan a las células bacterianas vegetativas, actúan como sideróforos, los protegen contra los rayos ultravioleta, inhiben a los posibles competidores, entre los que se encuentran otras bacterias y facilitan la comunicación con otras especies²⁵⁵. *Streptomyces* es una gran fuente de antibióticos usados hoy en día y representa un género bacteriano muy significativo. Aproximadamente el 70% de los antibióticos empleados en clínica provienen de los actinomicetos y mayormente de los *Streptomyces*, entre los que destacan la estreptomycin, el cloranfenicol, las tetraciclinas o las cefalosporinas²⁵⁶. Además, este género ha dado lugar a numerosos compuestos antitumorales, antifúngicos, anticancerígenos e inmunosupresores²⁵⁷. Otros metabolitos secundarios han mostrado actividades antioxidantes, manifestando un potencial en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas^{258, 259}.

La anidroexfoliamicina, un metabolito secundario de *Streptomyces* obtenido del desierto de Atacama, es un compuesto que ha mostrado propiedades antioxidantes y neuroprotectoras frente a desordenes neurodegenerativos (figura 14). La anidroexfoliamicina mejora la disfunción mitocondrial, reduce la producción de ROS y aumenta la producción de enzimas antioxidantes a través de la translocación de Nrf2 al núcleo^{260, 261}. Además, la anidroexfoliamicina reduce los signos distintivos de la enfermedad de Alzheimer, como las proteínas A β y tau, tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, sus efectos sobre la inflamación se desconocen.

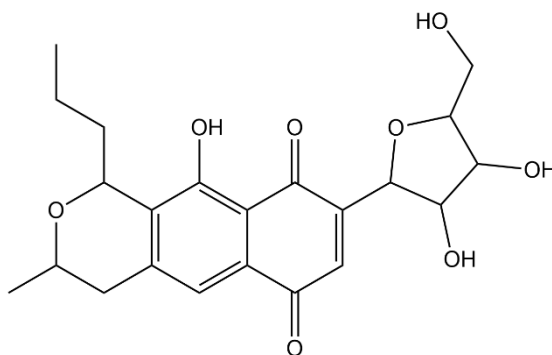


Figura 14. Estructura química de la anidroexfoliamicina aislada de *Streptomyces* sp.

1.3.2. Compuestos aislados a partir de cianobacterias

Las cianobacterias son microorganismos procariotas fotosintéticos que se encuentran en una diversidad de hábitats marinos, incluyendo los arrecifes de coral. Estos microorganismos tienen sistemas fotosintéticos complejos, ya que son capaces de canalizar la energía solar absorbida en otras formas de energía para la obtención de alimentos y metabolitos. Además, son biocatalizadores que se pueden usar en la producción sostenible de alimentos y biodiésel²⁶². Las cianobacterias también son conocidas por ser productoras de toxinas como la saxitoxina, la anatoxina o las microcistinas²⁶³. Estos microorganismos tienen una gran capacidad biosintética para producir metabolitos secundarios bioactivos con estructuras químicas novedosas²⁶⁴. La alta tasa de éxito de las cianobacterias a la hora de colonizar nuevos ecosistemas marinos puede estar relacionada con las funciones ecológicas de los metabolitos secundarios que producen, ya que las protegen de los rayos UV y de depredadores. Hasta la fecha, se han aislado más de 550 metabolitos secundarios de diversos géneros de cianobacteria, siendo los más prolíficos *Lyngbya*, *Moorea*, *Symploca* y *Oscillatoria*^{265, 266}. Estos metabolitos secundarios son interesantes desde el punto de vista de la industria farmacológica y cosmética, ya que han mostrado actividades antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas, inmunosupresoras y antituberculosas^{262, 267}. Muchos de estos metabolitos se usan como moléculas líderes para la síntesis de compuestos bioactivos, como es el caso del largazol. El largazol es un potente inhibidor de la histona desacetilasa de clase I, es decir, tiene actividad anticancerígena, aislado por primera vez de la cianobacteria *Symploca* sp.²⁶⁸. Entre los análogos sintéticos del largazol destaca el OKI-179, ya que ha mostrado interesantes propiedades antiproliferativas y apoptóticas contra numerosas líneas cancerígenas, así como buenas propiedades farmacocinéticas en modelos de ratón, rata y perro. Actualmente se encuentra en la fase I de ensayos clínicos para el tratamiento de tumores sólidos avanzados^{269, 270}. Otros metabolitos con interesantes actividades son la dolastatina 10 y 15, que son potentes inhibidores de microtúbulos. Originalmente, las dolastatinas fueron aisladas de *Dolabella auricularia*, sin embargo, ahora se sabe que estos compuestos son producidos por las cianobacterias de las que se alimentan²⁷¹. Las dolastatinas 10 y 15 y sus análogos sintéticos como las auristatinas, se han sometido a varios ensayos clínicos como anticancerígenos. Además, se descubrió que las auristatinas son muy útiles en la formulación de fármacos conjugados con anticuerpos (FCA). Este hallazgo condujo a la síntesis del fármaco conjugado con antígeno, el brentuximab vedotin o SGN-35 que fue aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*) en 2011 para el tratamiento del linfoma hodgkiniano refractario y el linfoma aplásico de células grandes²⁷². El brentuximab vedotin se dirige al receptor CD30 (muy expresando en las células tumorales) y libera de forma selectiva monometil auristatina E en las células cancerosas e induce su apoptosis. A partir de aquí, se han desarrollado más de 16 FCAs que incluyen auristatinas, que actualmente se encuentran en ensayos clínicos para la terapia del cáncer²⁷³.

1.3.3. Compuestos aislados a partir de microalgas

Las microalgas son un grupo de microorganismos autótrofos que crecen en ecosistemas marinos, de agua dulce y en el suelo y viven en condiciones extremas, incluyendo temperaturas, intensidad de luz, pH y salinidad. Al igual que las cianobacterias, también son organismos fotosintéticos y producen compuestos orgánicos en el proceso de la fotosíntesis. Entre las

ventajas de las microalgas destaca su crecimiento rápido, su alta capacidad fotosintética y la posibilidad de cultivarlas en condiciones de producción. Además, las microalgas producen diferentes sustancias bioactivas, como polisacáridos, lípidos, proteínas y pigmentos²⁷⁴. Muchas de estas sustancias son interesantes en diversos sectores biotecnológicos, incluyendo el sector de la alimentación, la salud, el medio ambiente y los biomateriales²⁷⁵. Ya que han mostrado interesantes actividades, como actividad anticancerígena, antiinflamatoria, antioxidante, antiaterosclerosis, antiosteoporosis e inmunomoduladora^{276, 277}. Además, algunas especies de microalgas son capaces de producir compuestos altamente tóxicos, como la saxitoxina, la palitoxina o el ácido ocaídoico. En humanos, la exposición a estas toxinas produce síndromes gastrointestinales y/o neurológicos, incluso pudiendo llegar a causar la muerte²⁷⁸. Sin embargo, estas actividades biológicas se han utilizado como herramientas de interés en la salud humana. Por ejemplo, la saxitoxina ha mostrado actividad como anestésico y la yesotoxina posee una interesante actividad anticancerígena, antiproliferativa y antialérgica²⁷⁹⁻²⁸².

1.3.4. Compuestos aislados a partir de hongos

Los hongos marinos son parásitos o saprófitos de otros organismos o materiales marinos. Como ocurre con las bacterias, estos microorganismos también se encuentran en tunicados, moluscos, corales o esponjas. Además, son una fuente prometedora de nuevos compuestos bioactivos ya que también pueden vivir en condiciones extremas²³⁶. En 1949 se aisló el primer metabolito secundario bioactivo de un hongo marino, la cefalosporina C, mediante un cultivo de *Cephalosporium* sp. La cefalosporina C pertenece a la familia de los antibióticos β -lactámicos y es uno de los primeros fármacos de origen marino en ser aprobados por la FDA²⁸³. Además, la cefalosporina C es el principal recurso para la producción de 7-aminocefalosporánico, un intermediario para la fabricación de numerosas cefalosporinas en la industria farmacéutica²⁸⁴. Desde el descubrimiento de la cefalosporina C, el aislamiento de nuevos compuestos naturales con bioactividad se ha visto ralentizado hasta la década de los 90s. Un ejemplo es la fenilhistina (halimida), obtenida del hongo *Aspergillus ustus*, que inhibe el ciclo celular de células de mamíferos²⁸⁵. Un derivado sintético de este compuesto, la plinabulina, tiene actividad anticancerígena al desestabilizar los microtúbulos. Este fármaco ha sido evaluado en estudios clínicos de fase III en pacientes con tumores sólidos avanzados y en combinación con docetaxel en cáncer de pulmón de células pequeñas. Además, está siendo evaluado en ensayos clínicos de fase I y II junto al nivolumab en pacientes con cáncer de pulmón avanzado²⁸⁶.

1.3.5. Compuestos aislados a partir de cnidarios

El filo Cnidaria engloba a más de 10.000 especies vivas acuáticas muy variadas, entre las que se encuentran las medusas, las plumas de mar, los corales, anémonas y avispas marinas²⁸⁷. Los cnidarios se encuentran en las primeras ramas del árbol del Reino Animal. Varias especies de este filo son muy longevas, lo que sugiere que tienen un mecanismo de defensa desarrollado, capaz de resistir la exposición repetida a los agentes patógenos microbianos²⁸⁸. Los estudios de los últimos años indican que el sistema inmunológico innato de los cnidarios no solo los defiende de los microorganismos dañinos, sino que también es esencial en la distribución de comunidades microbianas por los tejidos del animal. Estas comunidades microbianas aportan beneficios a los cnidarios, ya que ayudan a la defensa inmunológica, la resistencia a estresores

y también ayudan en el desarrollo y metabolismo del animal^{288, 289}. Además, también son beneficiosos para la salud de los corales y los ecosistemas de arrecife de coral²⁹⁰. Además, los cnidarios son compuestos marinos de especial interés, ya que producen compuestos biológicos con actividades interesantes. Dentro de este filo, la clase Anthozoa es la que ha contribuido con un mayor número de especies productoras de compuestos naturales bioactivos, entre los que destacan actividad antiinflamatoria, antitumoral, antimalaria, antimicrobiana y anticancerígena²⁹¹.

El orden Zoantharia, de la clase Anthozoa, engloba un grupo de pólipos marinos (corales) distribuidos en las regiones litorales templadas y tropicales de los océanos Índico, Pacífico y Atlántico²⁹². Los zoantharios son capaces de sintetizar una amplia gama de productos naturales con estructuras químicas únicas y bioactividades interesantes, como las zoanthaminas²⁹¹. Las zoanthaminas son una familia de alcaloides marinos, cuya estructura química consta de ciclos fusionados que culminan en un anillo azepano. La primera zoanthamina fue aislada a partir de cnidarios del género *Zoanthus* en el 1984 en la costa de la India. Más tarde se descubrieron nuevos alcaloides de tipo zoanthamina, incluyendo norzoanthamina, zoanthenamide y zoanthenamine²⁹³. Hasta el momento se han aislado 38 alcaloides de tipo zoanthamina, en especial del Pacífico Oriental y Medio Tropical. Algunos de estos alcaloides han mostrado citotoxicidad contra células leucémicas, así como actividades antiosteoporosis, antiinflamatorias, antibacterianas e inhibición de la agregación plaquetaria^{294, 295}. De un coral del Pacífico oriental *Zoanthus cf. pulchellus* han aislado dos alcaloides de zoanthamina nuevos, la 3-acetoxizoanthamina (figura 15d) y la 3-acetoxinorzoanthamina (figura 15e), de los cuales se desconoce su actividad. De este zoanthario también se han aislado tres zonataminas que ya habían sido anteriormente descritas, la zoanthamina (figura, 15a), la norzoanthamina (figura, 15b) y la 3-hidroxinorzoanthamina (figura, 15c)²⁹⁵.

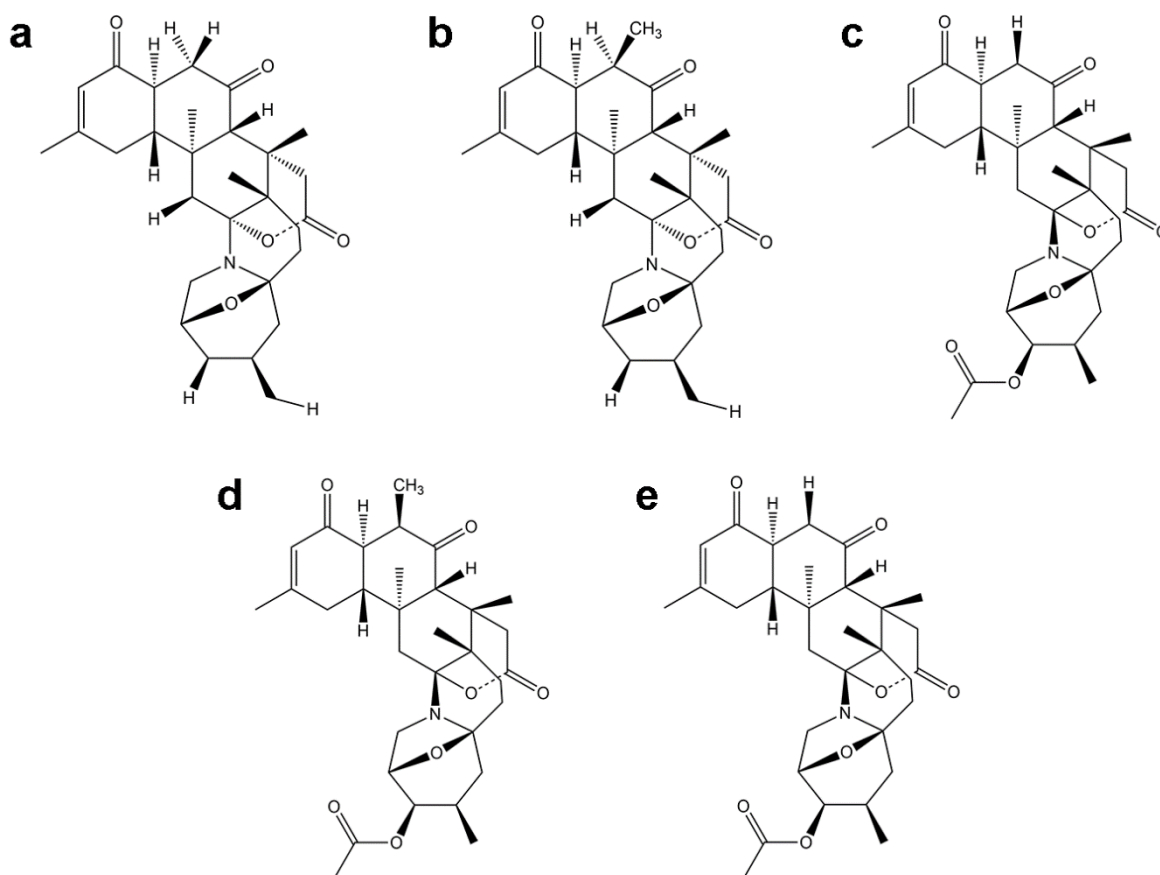


Figura 15. Estructura química de los alcaloides: zoanthamina (a), norzoanthamina (b), 3-hidroxinorzoanthamina (c), 3-acetoxizoanthamina (d) y 3-acetoxinorzoanthamina (e) aislados del cnidario *Zoanthus cf. pulchellus*

1.3.6. Compuestos aislados a partir de tunicados

Los tunicados, pertenecen al filo de los cordados, son animales marinos de vida libre o sésil, que viven solos o en colonias. De entre los numerosos compuestos naturales aislados de los tunicados, destacan varios por sus propiedades anticancerígenas. Entre ellos, la trabectedina (ET-743) es un alcaloide aislado del tunicado caribeño *Ecteinascidia turbinata*. Este compuesto es un alquilante muy potente, induce apoptosis y detiene el ciclo celular mediante la unión a los surcos menores del ADN, además, inhibe la diferenciación de monocitos y macrófagos asociados a tumores²⁹⁶. En Europa, trabectedina fue aprobado en 2007 para el tratamiento del sarcoma y en 2009 junto a la doxorrubicina para el tratamiento del cáncer de ovario en pacientes con recaída. Convirtiéndose así en el primer fármaco marino comercial idéntico al producto natural que es comercializado, aunque hoy en día es sintetizado en el laboratorio. Además, actualmente, se está evaluando su actividad sobre otras neoplasias, como el cáncer de próstata o de mama²⁹⁷. Otro compuesto potencial anticancerígeno es la plitidepsina, que fue aislado del tunicado mediterráneo *Aplidium albicans*²⁹⁸. Este compuesto es comercializado en su forma sintética. La plitidepsina es un depsipéptido cíclico que detiene el ciclo celular, inhibe el crecimiento, induce apoptosis a través de numerosas vías y modifica el microambiente que facilita el crecimiento tumoral²⁹⁹. Otros estudios han demostrado que este compuesto también

tiene efectos antiangiogénicos tanto *in vivo* como *in vitro*³⁰⁰. La plitidepsina se ha evaluado en numerosos ensayos clínicos de fase I y II, tanto sola como en combinación con otros fármacos. En el 2010 han comenzado los ensayos clínicos de fase III, mostrando resultados positivos junto a la dexametasona en el tratamiento del mieloma múltiple refractario o recidivante³⁰¹. Por otro lado, en los últimos meses ha mostrado inhibición de la replicación del SARS-CoV-2 a concentraciones nanomolares en pacientes hospitalizados por coronavirus³⁰².

1.3.7. Compuestos aislados a partir de esponjas

La esponja, del filo *Porífera*, se considera una de la mayor fuente de compuestos activos de entre los organismos marinos, contribuyendo al 30% de los productos marinos naturales hasta la fecha. Esto se debe a que las esponjas son invertebrados sésiles que no poseen un sistema inmunológico innato ni ninguna estructura de defensa como pueden ser espinas o conchas. Por este motivo, el único mecanismo de defensa que poseen es la producción de sustancias que actúen como dispositivos de defensa y les permita adaptarse al medio^{303, 304}. Por otro lado, las esponjas se caracterizan por ser el hospedador de diversos grupos de microorganismos con los que viven en simbiosis, siendo estos hasta el 60% de la biomasa de la esponja. Esta asociación simbiótica lleva consigo determinados beneficios como la ingesta de nutrientes, la estabilización del esqueleto de la esponja, la eliminación de desechos y también la producción de metabolitos secundarios con una amplia variedad química³⁰⁵. Las esponjas son la fuente más abundante de productos naturales, representando hasta el 30% de todos los productos naturales de origen marino reportados hasta la fecha. Entre las moléculas bioactivas aisladas de esponjas se encuentran nucleósidos, esteroides, alcaloides, peróxidos, terpenos, ácidos grasos, derivados de aminoácidos y péptidos cíclicos, de los cuales al menos 60 tienen potencial quimiopreventivo y/o anticancerígeno³⁰⁴. La esponja caribeña *Tethya crypta* fue el primer microorganismo marino en ser estudiado en detalle, entre 1950 y 1960. A partir de los compuestos naturales aislados de esta esponja se desarrolló un análogo sintético, la citarabina o Ara-C, un fármaco antineoplásico aprobado en 1969. La citarabina sigue usándose hoy en día se usa para el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda, la leucemia mieloide aguda, el linfoma no hodgkiniano y el síndrome^{306, 307}. Otro fármaco obtenido a partir de los estudios sobre la esponja *Tethya crypta* es la vidarabina o Ara-A, un fármaco antiviral aprobado en 1979, actualmente en desuso debido a su estrecha ventana terapéutica³⁰⁸. Además, la zidovudina, derivado sintético del arabinósido de citosina, ha sido el primer fármaco antirretroviral, aprobado en 1987 como tratamiento contra el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida³⁰⁹.

Muchas de las sustancias activas aisladas de las esponjas son de origen bacteriano, ya que dentro de sus tejidos, las esponjas albergan una amplia comunidad bacteriana³¹⁰. Además, se ha hipotetizado que los microorganismos simbioses que albergan las esponjas son los productores originales de los compuestos bioactivos^{305, 311}.

1.3.7.1. Compuestos aislados de la esponja *Spongionella gracilis*

Las gracilinas son compuestos diterpenos aislados de los extractos de la esponja mediterránea *Spongionella gracilis*, perteneciente a la clase Desmospongiae. Las gracilinas son estructuralmente especiales, debido a un inusual diacetoxi furanosa que contienen casi todos sus miembros. Esta familia de compuestos se conoce desde hace décadas, el primer compuesto en ser descrito fue la gracilina A en 1985³¹². La gracilina A es un potente inhibidor de la

fosfolipasa A₂, enzima relacionada con procesos inflamatorios y con el mecanismo de acción del veneno de algunos artrópodos y reptiles³¹³. Además de la gracilina A, las gracilinas L (figura 16), H y la tetrahydroaplysulfurina-1, muestran toxicidad frente a la línea linfoblastoide de leucemia mieloide crónica humana K562 y células mononucleares de sangre periférica. Estos diterpenos tienen un potencial efecto anticancerígeno, ya que inhiben el receptor tirosina quinasa del factor de crecimiento epidérmico, en concreto, la gracilina L es la más potente³¹⁴. Por otro lado, estos compuestos tienen actividades antioxidantes y neuroprotectoras ya que protegen a las neuronas corticales de ratón del estrés oxidativo *in vitro*, actuando sobre las mitocondrias y las vías Nrf2/ARE³¹⁵. En modelos *in vitro* de enfermedades neurodegenerativas, las gracilinas inhiben la fosforilación de Tau y β -secretasas y en modelos *in vivo* de la enfermedad de Alzheimer, la gracilina L y H han mostrado resultados prometedores³¹⁶.

Por otro lado, se ha demostrado que las gracilinas tienen propiedades antiinflamatorias y neuroprotectoras debido a la capacidad que tienen de unirse a las Cyps, de la misma manera que lo hace la CsA³¹⁷. De esta forma, las gracilinas que tienen afinidad por la CypA, bajo condiciones inflamatorias, reducen la expresión del receptor de membrana CD147 y la liberación de CypA al medio³¹⁸. Además, estos compuestos bloquean la translocación al núcleo de NFAT, inhibiendo la activación de los linfocitos T humanos y la liberación de IL-2 al medio^{317, 318}. Por lo tanto, las gracilinas con afinidad por la CypA muestran interesantes efectos inmunosupresores y antiinflamatorios. Por otro lado, los compuestos con afinidad hacia la CypD muestran efectos neuroprotectores y antioxidantes, ya que bloquean la apertura del poro mitocondrial, imitando a la CsA³¹⁷.

De entre el grupo de las gracilinas, la gracilina A es la que ha mostrado actividades inmunosupresoras y neuroprotectoras más potentes. La gracilina A tiene afinidad por la CypA, e inhibe la actividad PPIasa tanto de la CypA como de la D. Por este motivo, esta gracilina fue usada como molécula líder para obtener otras moléculas bioactivas de menor tamaño, mediante retrosíntesis dirigida por farmacóforos. De esta forma se obtuvieron pequeñas moléculas sintéticas con capacidad inmunosupresora o neuroprotectora al unirse a la CypA o D, respectivamente³¹⁹.

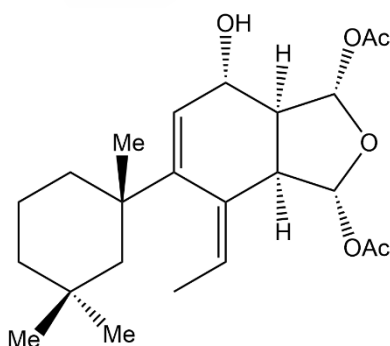


Figura 16. Estructura química de la gracilina L aislada de la esponja *Spongionella gracilis*

1.3.7.2. Compuestos aislados de *Characella pachastrelloides*

Las characellides son metabolitos secundarios de la esponja *Characella pachastrelloides*, también perteneciente a la clase Desmospongiae, obtenida en el suroeste de la costa de Irlanda. Las characellides representan una nueva familia de compuestos, cuya estructura única incluye

un tripéptido glicosílico e hidrófilo central (O-Me-Tyr-Asp-Thr) unido a una cadena de alquilo larga y lipofílica junto con unidades de azúcar en la treonina terminal, con actividad desconocida (figura 17).

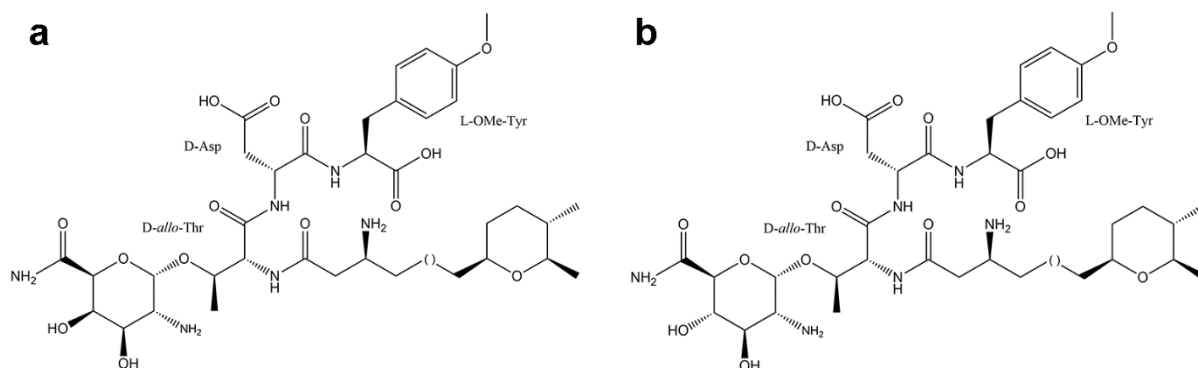


Figura 17. Estructura química de la characellide A (a) y la characellide B (b) aislados de la esponja *Characella pachastrelloides*. La characellide A es epímero de la B

1.3.7.3. Compuestos aislados de *Narrabeena nigra*

La esponja *Narrabeena nigra* se encuentra alrededor de las islas Futuna, en el Océano Indo-Pacífico. Las islas Futuna, que incluyen la isla Futuna y Alofi, son de origen volcánico y se encuentran rodeadas de una franja de arrecife, por lo cual, son zonas muy abundantes en esponjas. En la costa de las islas Futuna, no se había realizado un inventario detallado de sus esponjas litorales hasta la expedición del Tara Pacific³²⁰. El Océano Indo-Pacífico es un área clave para el descubrimiento de especies marinas, no solo por la rica biodiversidad marina que posee, sino también, porque los invertebrados de islas remotas suelen presentar una alta tasa de endemidad, lo que también podría llevar al descubrimiento de nuevos metabolitos bioactivos³²¹.

La esponja *Narrabeena nigra* fue descrita por primera vez en 2010 en la costa de Corea. Se realizó un perfil químico preliminar y más tarde se procedió a un estudio más exhaustivo debido a la presencia de una alta cantidad de alcaloides bromados³²². De esta esponja se aislaron e identificaron 8 alcaloides bromados, 7 nuevos metabolitos de bromotriptamina y otro nuevo derivado de bromotiramina (tabla 2) junto con 10 análogos bromados descritos anteriormente (tabla 3)³²³⁻³²⁵. Se desconoce la actividad biológica de estos compuestos.

Tabla 2. Estructura química de los nuevos alcaloides bromados: 7 nuevos metabolitos de bromotriptamina y un nuevo derivado de bromotiramina aislados de la esponja *Narrabeena nigra*

NOMBRE	ESTRUCTURA QUÍMICA
5,6-DIBROMO-N-CLOROMETIL-N,N-DIMETILTRIPTAMINA	

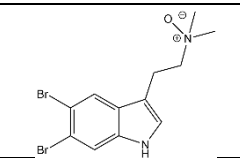
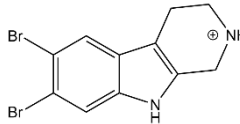
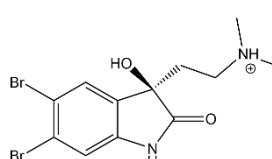
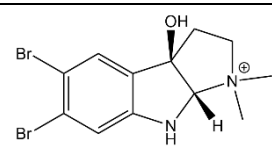
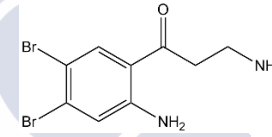
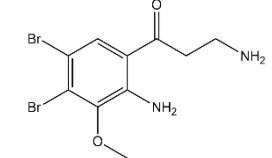
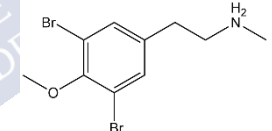
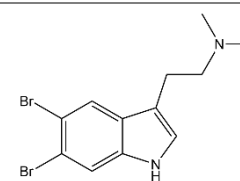
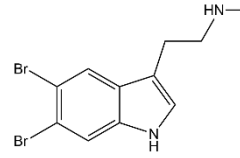
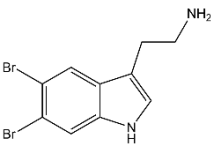
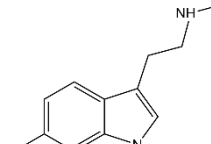
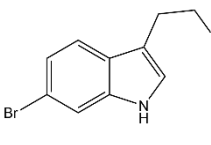
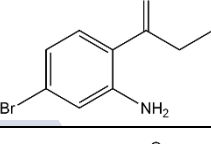
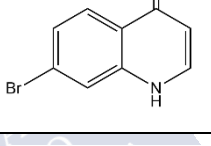
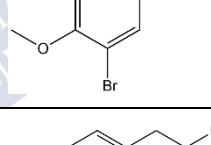
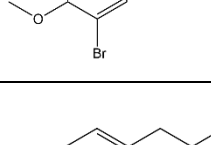
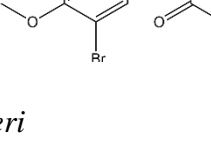
5,6-DIBROMO- <i>N,N,N</i> -DIMETILOXIDETRIPTAMINA	
5,6-DIBROMO- <i>N</i> -METILTETRAHIDRO-B-CARBOLINA	
NARRABEENAMINA A	
NARRABEENAMINA B	
5,6-DIBROMOKIMURAMINA	
5,6-DIBROMO-7-METOXIKIMURAMINA	
3,5-DIBROMO-4-METOXI-N-METILTIRAMINA	

Tabla 3. Estructura química de 10 alcaloides bromados aislados de la esponja *Narrabeena nigra*

NOMBRE	ESTRUCTURA QUÍMICA
5,6-DIBROMO- <i>N,N</i> -DIMETILTRIPTAMINA	
5,6-DIBROMO- <i>N</i> -METILTRIPTAMINA	

5,6-DIBROMOTRIPTAMINA	
6-BROMO-N-METILTRIPTAMINA	
6-BROMOTRIPTAMINA	
6-BROMOQUINURAMINA	
7-BROMOQUINOLIN-4(1H)-ONA	
3,5 DIBROMO-4-METOXITIRAMINA	
3- BROMO-4-METOXI-N,N,N-TRIMETILTROSINA	
3-BROMO-4-METOXITIRAMINA	

1.3.7.4. Compuestos aislados de *Stylissa aff. carteri*

La esponja *Stylissa aff. carteri*, ha sido recolectada en la costa de las islas Futuna. A partir de esta esponja se han aislado e identificado 7 alcaloides de pirrol-imidazol³²⁶. Los alcaloides de pirrol-imidazol constituyen una conocida familia de productos naturales aislados de esponjas³²⁷. Desde que se aisló el primer miembro de esta familia, en 1969, la dibromofakellina de la esponja *Phakellia flabellada*, se han identificado más de 220 alcaloides³²⁸. De entre los alcaloides de *Stylissa aff. carteri*, 3 han sido identificados por primera vez: la futunamina (figura 18a) con un nuevo núcleo pírrolo imidazol y dos nuevos análogos hexacíclicos de Palauamina y styloguanidina, la debromokonbuacidina (figura 18b) y la didebromocarteramina (figura 18c).

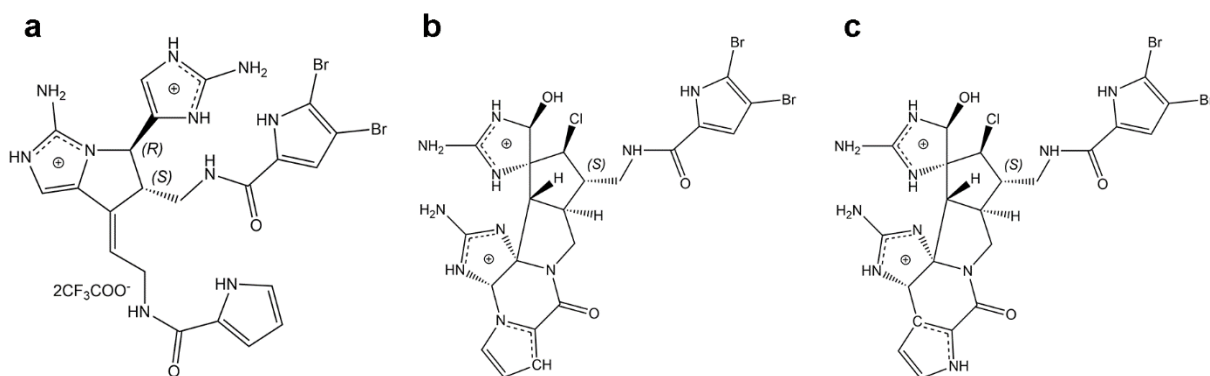


Figura 18. Estructura química de los nuevos alcaloides de pirrol-imidazol: futunamina (a), debromokonbuacidina (b) y didebromocarteramina (c) aislados de la esponja *Stylissa aff. carteri*

De esta esponja, también se han identificado 4 alcaloides pírrolo imidazol ya conocidos: la esceptrina (figura 19a), la manzacidina A (figura 19b), la himenidina (figura 19c) y la oroidina (figura 19d). La esceptrina inhibe la motilidad celular de numerosas líneas celulares de cáncer y dado que la motilidad es un factor clave en varias enfermedades como el cáncer o la inflamación crónica, la esceptrina es una molécula interesante para el estudio de la modulación de estas enfermedades, así como una herramienta de investigación útil para dilucidar los mecanismos implicados en la motilidad celular³²⁹. La manzacidina A se probó como antiparasitario en varios estudios *in vitro*, sin embargo, no mostró ningún resultado destacado, pero sí es capaz de inhibir las quinasas^{330, 331}. La himenidina ha mostrado actividades significativas, es capaz de inhibir el proteasoma y los receptores serotoninérgicos, asimismo, también ha dado buenos resultados inhibiendo la metástasis *in vitro* que tiene lugar durante el cáncer de pulmón³³²⁻³³⁴. También se estudió la actividad antiparasitaria de la himenidina, dando mejores resultados inhibiendo el crecimiento de 4 protozoos que la manzacidina A, debido a su actividad antiserotoninérgica³³⁰. Por otro lado, tanto la himenidina como la oroidina modulan los canales de sodio y calcio dependientes del voltaje³³⁵. De entre los alcaloides aislados de *S. aff. carteri*, la oroidina es el más estudiado y el más activo. De entre las actividades que ha mostrado, destaca la actividad antiviral, anticancerígena y antimicrobiana^{239, 336, 337}. Sin embargo, estos compuestos no han sido estudiados en modelos celulares de inflamación.

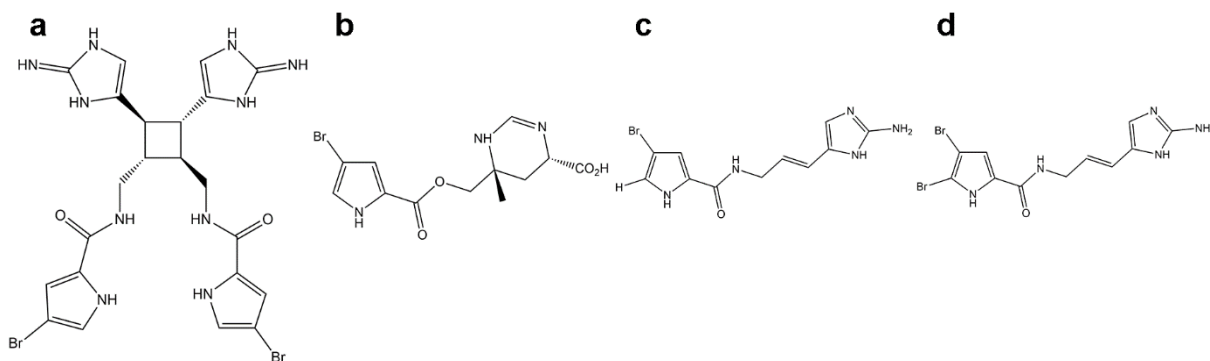


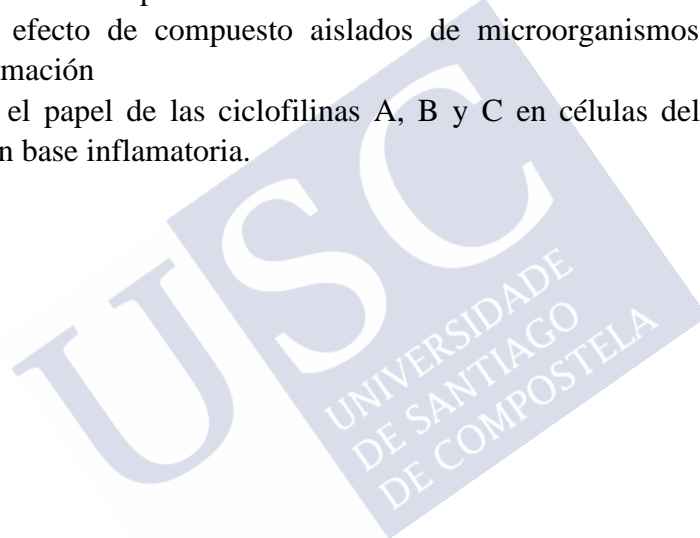
Figura 19. Estructura química de los alcaloides conocidos de pirrol-imidazol: la esceptrina (a), la manzacidina A (b), la himenidina (c) y la oroidina (d) aislados de la esponja *Stylissa aff. carteri*

2. OBJETIVOS

La inflamación crónica es la causa subyacente de enfermedades que producen una alta morbilidad y mortalidad en los países desarrollados. Por lo tanto, es fundamental determinar el papel que desempeñan los componentes involucrados en la respuesta inflamatoria y disponer de herramientas farmacológicas para su modulación. Las ciclofilinas son proteínas relacionadas con la inflamación cuya función no ha sido completamente definida y para las que no existen compuestos específicos salvo la ciclosporina A. La identificación de estructuras con actividad antiinflamatoria que sirvan como moléculas guía tiene un gran interés farmacológico. En este contexto los objetivos de la presente tesis doctoral son:

- Estudiar el efecto de compuesto aislados de microorganismos marinos en modelos celulares de inflamación

- Determinar el papel de las ciclofilinas A, B y C en células del sistema inmune y en enfermedades con base inflamatoria.





3. MATERIAL Y MÉTODOS

Esta sección contiene los materiales, reactivos, líneas celulares y métodos utilizados durante la presente Tesis Doctoral.

3.1. REACTIVOS Y MATERIALES

Las células SH-SY5Y de neuroblastoma humano, fueron adquiridas en la American Type Culture Collection, número CRL2266. Las células BV2 de microglía de ratón fueron obtenidas en InterLab Cell Line Collection, number ATL03001.

Los reactivos se han adquiridos a las siguientes casas comerciales:

- Thermo Fisher Scientific (Madrid, España): medio de cultivo DMEM (del inglés *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), nutriente Mix F-12, medio de cultivo RPMI (del inglés *Roswell Park Memorial Institute Medium*), suero fetal bovino, glutamax, penicilina-estreptomicina (10000 U/mL), Tripsina/EDTA al 0,05%, SuperSignal west pico, SuperSignal west femto, diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA), Tetrametilrodamina metil éster (TMRM), el kit Griess Reagent para la cuantificación de nitrito y el anticuerpo monoclonal anti-Actina (cat. #ACTN05 (C4), lot. #SK2474691D).

- Merk Life Science (Madrid, España): la saponina, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), magnetic bead panel Milliplex® map kit (#MHSTCMAG-70k), Human High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel, Milliplex® map kit (#HSTCMAG-28SK), kit de migración celular Chemotaxis 5 µm 96-Well Cell Migration Assays (ECM512), millicell® hanging cell culture insert (0.4 µm), membrana de fluoruro de polivinilideno, el anticuerpo anti-NF-E2-related factor 2 (cat. #ABE413, lot. #3035180), el anticuerpo anti-NFκB p65 (cat. #ABE347, lot. #2897243), el anticuerpo anti-rabbit IgG (cat. #AP132P), el anticuerpo anti-mouse IgG (cat. #GENA931), albúmina de suero bovino, ciclosporina A (pureza ≥ 98.5 %), kit de aislamiento del RE (cat# ER0100), Sodio-dodecil-sulfato (SDS) y LPS.

- Abcam: los anticuerpos Anti-Lamin B1 (cat. #ab16048, lot: #GR3188002-1), anti-iNOS (cat. #ab178945, lot. #GR324713-8), anti-CypF (cat. No. ab64935, lot. GR51090-7) y la proteína humana ciclofilina A recombinante (activa, ab86219).

- Elabscience (Madrid, España): los anticuerpos PPIA (cat. #E-AB-15306, lot. #DK0674) y PPIB (cat. E-AB-22123, lot. AC0235) y el kit de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, (del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) para la ciclofilina D (E-EL-H1936).

- Bio-Rad (Barcelona, España): los geles de poliacrilamida y el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope.

- BD Biosciences: los anticuerpos anti-p-JNK/SAPK (pT183/pY185) (cat. 612540) y anti-JNK/SAPK1 (cat. 610627).

- Cusabio (Madrid, España): los kits de ELISA humano para la ciclofilina A (CSB-E09920H), la ciclofilina B (CSB-E11218H), y la PPIC (CSB-EL018473HU).

- Roche (España): tabletas de inhibidor de fosfatasa y tabletas de inhibidor de proteasa.
- Miltenyi Biotec (Alemania): el kit de aislamiento de linfocitos T Pan T cell Isolation Kit y el anticuerpo anti-CD3 humano FITC, clon BW264/56.
- Immunostep (Salamanca, España): el anticuerpo anti-CD147 FITC humano.
- GE Healthcare (Madrid, España): percoll.
- Antibodies-online: la proteína humana CypB (active; Cat. No. ABIN1304473).
- Molecular Probes (Leiden, Netherlands): los colorantes fluorescentes Oregon Green® 514 Phalloidin para el etiquetado de F-actin y Texas Red DNase I para el etiquetado de G-actina.

3.2. COMPUESTOS

En el laboratorio del Dr. Thomas P. Olivier (Marine Biodiscovery, Facultad de Química e Instituto Ryan de la Universidad Nacional de Irlanda, Galway) se han aislado los siguientes compuestos con actividad desconocida:

- A partir del cnidario *Zoanthus cf. pulchellus* 5 compuestos denominados zoanthaminas: 3-acetoxizoanthamina, 3-acetoxinorzoanthamina, zoanthamina, norzoanthamina y 3-hidroxinorzoanthamina.
- A partir de la esponja *Characella pachastrelloides* 2 compuestos denominados characellides: characellide A y characellide B.
- A partir de la esponja *Narrabeena nigra* 18 compuestos denominados futunas: 5,6-dibromo-*N*-clorometil-*N,N*-dimetiltriptamina, 5,6-dibromo-*N,N,N*-dimetiloxidetriptamina, 5,6-dibromo-*N*-metiltetrahidro- β -carbolina, narrabeenamina a, narrabeenamina b, 5,6-dibromokimuramina, 5,6-dibromo-7-metoxikimuramina, 3,5-dibromo-4-metoxi-*N*-metiltiramina, 5,6-dibromo-*N,N*-dimetiltriptamina, 5,6-dibromo-*N*-metiltriptamina, 5,6-dibromotriptamina, 6-bromo-*N*-metiltriptamina, 6-bromotriptamina, 6-bromoquinuramina, 7-bromoquinolin-4(1H)-ona, 3,5 dibromo-4-metoxitiramina, 3-bromo-4-metoxi-*N,N,N*-trimetiltirosina y 3-bromo-4-metoxitiramina.
- A partir de la esponja *Stylissa aff. carteri* 7 compuestos denominados futunaminas: futunamina, debromokonbuacidina, didebromocarateramina, esceptrina, manzacidina A, himenidina y oroidina

El Dr. Marcel Jaspars (Universidad de Aberdeen, Escocia) ha proporcionado el compuesto natural gracilina L, aislado de la esponja *Spongionella gracilis* y la anhidroexfoliamicina aislada de *Streptomyces sp.*

El grupo del Dr. Daniel Romo (Departamento de Química y Bioquímica de la Universidad de Baylor) sintetizó los análogos de la gracilina A aislada de la esponja *Spongionella gracilis*, los compuestos **1** y **2**.

Todos los compuestos se disolvieron en DMSO a una concentración de 10 mM y se guardaron a -80°C hasta su uso.

3.3. COMPOSICIÓN DISOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

- Medio de cultivo para las células neuronales SH-SY5Y: medio DMEM/F-12 suplementado con albúmina de suero bovino al 10%, glutamax, 100U/mL penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina.
- Medio de cultivo para las células de la glía BV2 y para los linfocitos T humanos: medio RPMI suplementado con albúmina de suero bovino al 10%, penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina.
- Solución de Locke's: 3,6 mM de NaHCO₃, 154 mM de NaCl, 5,6 mM de KCl, 1,3 mM de CaCl₂, 1mM de MgCl₂, 10 mM de HEPES y 5 mM de glucosa, pH 7,2-7,4.
- SDS al 5% en Locke's.
- Solución salina tamponada con fosfato (PBS, del inglés *phosphate buffered saline*): 137 mM de NaCl, 8,2 mM de Na₂HPO₄, 1,5 mM de KH₂PO₄ y 3,2 mM de KCl, pH 7,2-7,4.
- PBS-T: PBS + 0,1 % de Tween-20.
- PBS-EDTA: PBS + 2 mM de EDTA, pH 7,2-7,4.
- Tampón de lisis hipotónico de extracción del citosol para western blot: 20 mM de Tris-HCl, 10 mM de NaCl y 3 mM de MgCl₂, pH 7,2-7,4. En el momento de uso se añade el coctel de inhibición de proteasas (Clorhidrato de fluoruro de 4- (2-aminoetil) bencenosulfonilo, aprotinina, bestatina, E-64, leupeptina y pepstatina A) y fosfatasas (fluoruro de sodio, ortovanadato de sodio, pirofosfato de sodio y beta-glicerofosfato).
- Tampón de extracción de proteína nuclear para western blot: 100 mM de Tris pH 7.4, 2 mM de Na₃VO₄, 100 mM de NaCl, 1% Tritón X-100, 1 mM de EDTA, 10% glicerol, 1 mM EGTA, 0,1% SDS, 1 mM de NaF, 0,5% desoxicolato de sodio y 20 mM de Na₄P₂O₇. En el momento de uso se añade 1 mM de PMSF y el coctel de inhibición de proteasas.
- Tampón de carga de proteínas para western blot: 125 mM de Tris-HCl (pH 6,8), 20% de glicerol, 4% de SDS, 10% de β-mercaptoetanol y 0,004% de azul de bromofenol.
- Solución de electroforesis (Laemmli): 25 mM de trizma base, 192 mM de glicina y 0,1 % de SDS.
- Solución de transferencia: 25 mM de trizma base, 192 mM de glicina, 0,1 % de SDS y 20% de metanol.
- Solución de Ubreit: 119 mM de NaCl, 5,94 mM de KCl, 22,85 mM de NaHCO₃, 1,2 mM de MgSO₄, 1,2 mM de NaH₂PO₄, 1 mM de CaCl₂ y 1 g/L de glucosa, pH 7.2-7.4. Para algunos experimentos se utiliza esta solución suplementada con 1 mM de CaCl₂.
- Percoll isotónico al 57,5%: percoll al 57,5% disuelto en PBS-EDTA. El percoll comercial es hipotónico, para que sea isotónico del 57,5% de la disolución final, 9 partes son de percoll comercial y una parte de Umbratil 10X.

3.4. CULTIVOS CELULARES

Se ha utilizado la línea celular de microglía de ratón BV2y la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Estas líneas se han mantenido a 37°C en una atmósfera modificada con 5% de CO₂ y 95% de aire en un incubador (Mettler). Para el mantenimiento del cultivo se siembran a una densidad de 2 x 10⁶ células por flask (Jet Biofil).

La línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma se mantuvo en medio DMEM/F-12 suplementado. Un día antes de los ensayos, las células se siembran en placas de 96 pocillos a una densidad de 50.000 células/pocillo.

La línea celular de microglía BV2 se mantuvo en medio RPMI suplementado. Un día antes de los ensayos, las células se siembran en placas de 96 pocillos a una densidad de 4×10^4 células/pocillo; en placas de 24 a una densidad de 5×10^5 células/pocillo o en placas de 12 a una densidad de 1×10^6 células/pocillo.

3.5. MUESTRAS HUMANAS: LINFOCITOS T Y SUERO

Los estudios con sangre y linfocitos T humano han sido aprobados por el comité de ética de la investigación de Santiago-Lugo (código de registro: 2019/639). Todos los donantes han dado su consentimiento informado por escrito mediante la firma del “Documento de consentimiento para la participación en estudios de investigación”.

Para la purificación de linfocitos T se obtuvo sangre periférica de la vena antecubital de cada sujeto utilizando tubos con EDTA (tubos de suero BD vacutainer) y se siguieron los siguientes pasos: en el fondo de tubos de 10 mL se colocaron 3 mL de percoll isotónico al 57,5 %. Sobre la superficie del percoll isotónico, se añadieron 4 mL de sangre (diluida 1:1 con PBS-EDTA) con cuidado para no mezclar la sangre con el percoll. Los tubos se centrifugaron durante 25 min a 3000 rpm a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, se obtienen 3 fases: una fase rica en glóbulos rojos, la interfase con los glóbulos blanco, donde se encuentra la población de linfocitos T y otra fase con el suero diluido en PBS-EDTA. Con la ayuda de una pipeta, se coge la interfase de glóbulos blancos y la llevamos a otro tubo de 10 mL, se lavan con PBS-EDTA y se centrifugan durante 10 min a 1500 rpm y temperatura ambiente. Repetimos el paso anterior de lavado y centrifugado. Después, para separar los linfocitos T del resto de los glóbulos blancos utilizamos el kit de aislamiento “Pan T cell isolation kit” y seguimos las instrucciones del fabricante. La pureza de los linfocitos T obtenidos es siempre $\geq 95\%$. Esta pureza se midió mediante citometría de flujo, usando un anticuerpo monoclonal para CD3 humano marcado con FITC. Dependiendo de los experimentos a realizar, los linfocitos T obtenidos se resuspenden en RPMI suplementado y se mantienen a 37°C en una atmósfera modificada con 5% de CO₂ y 95% de aire o bien se resuspenden en solución de Umbrat con Ca²⁺.

Para las muestras de suero, se obtuvo sangre periférica de la vena antecubital de cada sujeto utilizando tubos libres de anticoagulante (tubos de suero BD vacutainer). Las muestras de sangre se dejaron coagular durante 30 min a temperatura ambiente antes de la centrifugación (3000 rpm, durante 10 min a 4 °C). Los sobrenadantes de suero se recogieron y almacenaron a -80 °C hasta que se necesitaron para el análisis. Las muestras se descongelaron solo una vez.

3.6. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

Para evaluar la viabilidad celular se utiliza el ensayo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)³³⁸. El MTT es un compuesto soluble en agua, de color amarillo que pertenece a la familia de sales de tetrazolio. Cuando el MTT es reducido, cambia al color azul y se vuelve insoluble en agua, convirtiéndose en formazano de MTT (figura 20). Generalmente, el proceso de reducción del MTT tiene lugar en las mitocondrias y en este

proceso pueden participar el succinato deshidrogenasa mitocondrial y el citocromo c. Los cristales de formazán obtenidos después de la reducción del MTT se disuelven en disolventes orgánicos y se cuantifica midiendo su absorbancia, a una longitud de onda de entre 570 y 595 nanómetros (nm)³³⁹. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido, por lo tanto, a mayor absorbancia, mayor número de células vivas.

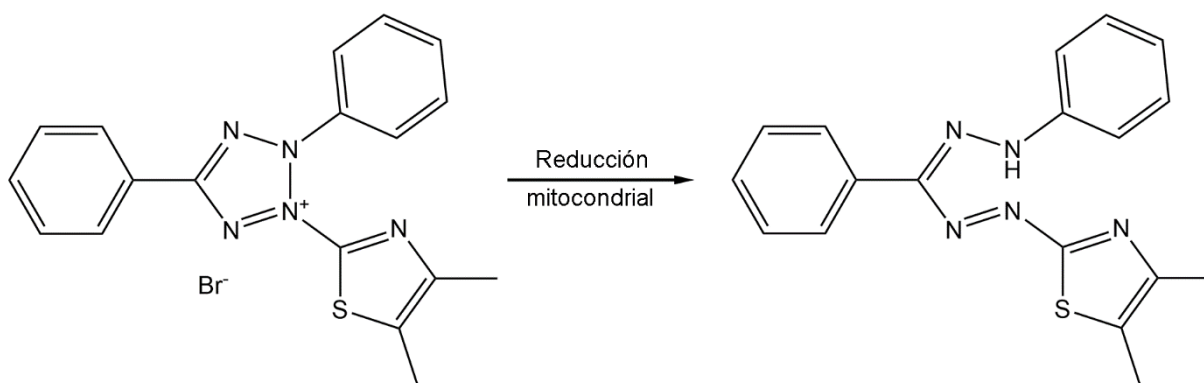


Figura 20. Forma oxidada del MTT (sal de tetrazolio; izquierda) y forma reducida del MTT (formazano de MTT; derecha)

Para el ensayo MTT, las células son tratadas durante 24 o 6 horas con los compuestos de interés. A continuación, se retira el medio de cultivo y se lavan las células con solución de Locke's y se incuban con MTT (500 µg/mL) disuelto en Locke's durante 1 hora. La incubación se hace a 37°C, en agitación (300 rpm) y en oscuridad. Después de la incubación se aspira el MTT y se añade SDS al 5% para disolver los cristales de formazán y poder cuantificar su absorbancia. La absorbancia de los cristales formados se mide a 595 nm en un espectrofotómetro lector de placas (Sinergy 4 de BioTek). Como control de muerte celular se usa 1 mg/mL de saponina y su absorbancia se resta a los otros datos.

3.7. ESTUDIOS DE VARIACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Las variaciones del potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) mitocondrial se determinaron usando el colorante fluorescente tetrametilrodamina metil éster (TMRM). La TMRM es un catión lipofílico que penetra con facilidad en las células. Este compuesto es secuestrado por mitocondrias y se acumula en la en la membrana interna y la matriz mitocondrial de forma indirectamente proporcional al potencial de membrana. Cuanto más polarizada está la mitocondria, mayor será su potencial de membrana. De esta forma, este fluoróforo se acumula en mayor medida en las mitocondrias sanas, emitiendo mayor fluorescencia roja. Por otro lado, cuando el potencial de membrana mitocondrial se despolariza, se produce la salida del fluoróforo de la célula, disminuyendo su fluorescencia, al contrario, cuando se hay una hiperpolarización, aumenta la fluorescencia³⁴⁰.

Para la medición de las $\Delta\Psi_m$ se incuban las células con los compuestos durante 24 horas. Transcurrida la incubación, se retira el medio de cultivo y se lavan las células tres veces con PBS y se incuban con TMRM 1 µM disuelto en PBS durante 30 min a 37°C en agitación (300 rpm). Por último, se añade agua/DMSO (1:1) y se lee la fluorescencia en el lector de placas (536 nm de excitación y 590 nm de emisión).

3.8. ENSAYO DE LA PRODUCCIÓN DE ROS INTRACELULAR

Los niveles intracelulares de ROS se midieron usando el diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA). Este compuesto entra en las células y se acumula principalmente en el citosol donde es desacetilado por esterasas originándose DCFH. Este producto es oxidado por las ROS intracelulares dando lugar a DCF⁻, un compuesto fluorescente (495 nm de excitación y 527 nm de emisión) como se muestra en la figura 21. Por lo tanto, la fluorescencia del DCF⁻ es proporcional a la presencia de ROS intracelular³⁴¹.

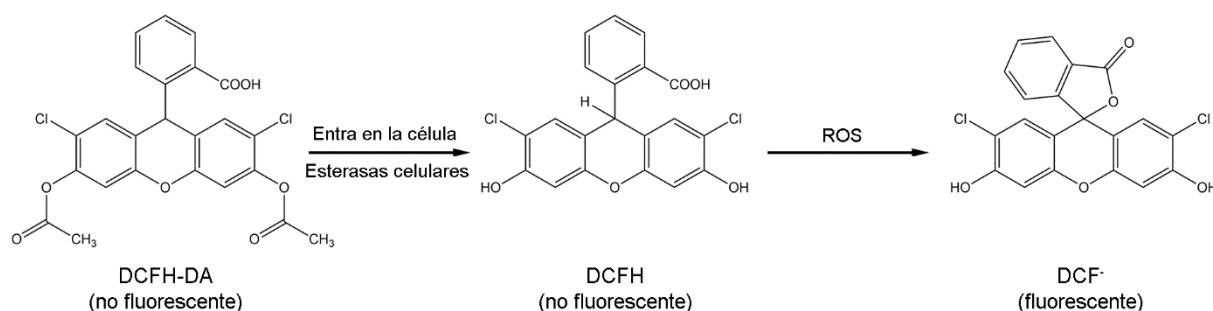


Figura 21. Esquema de la desacetilación y oxidación de la molécula DCFH-DA a DCF⁻

Para este experimento, las células fueron tratadas durante 24 o 6 horas. Trascurrido el tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron tres veces con PBS y se incubaron 1 hora a 37°C en agitación (300 rpm) con DCFH-DA a 20 μM. Después, las células se lavaron con PBS y se mantuvieron con PBS a 37°C durante 30 minutos hasta la medición de la fluorescencia de DCF⁻ en el lector de placas (495 nm de excitación y 527 nm de emisión).

3.9. ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DE ÓXIDO NITROSO (NO)

La concentración de NO en el medio de cultivo celular se estableció con el kit comercial del reactivo de Griess. Para este ensayo, las células son tratadas con los compuestos durante 24 horas. Después de la incubación se mide la liberación del NO en el cultivo celular siguiendo las instrucciones del manual del kit.

3.10. ESTUDIOS DE DETERMINACIÓN PROTEICA (WESTERN BLOTTING)

3.10.1. Separación fracciones de citosol, núcleo y fracción rica en retículo endoplasmático y aparato de Golgi

Después de las incubaciones con los compuestos, las células se recogen y se lavan tres veces con PBS frío. Para la extracción de las fracciones de citosol y núcleo, las células se suspendieron en 100 μL de buffer de lisis hipotónico (sección 3.2) durante 15 minutos. Después se añaden 5 μL de Tritón X-100 a las células y se centrifugaron a 4°C y 3000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se recoge como la fracción citosólica y el pellet se suspende en 30 μL de buffer de extracción nuclear (sección 3.2) durante 30 minutos, agitando la suspensión celular en un agitador tipo vórtex cada 10 minutos. Después, las células se centrifugan durante 30 minutos a 1400 g y 4°C. El sobrenadante se recoge como la fracción de proteínas nucleares. La cuantificación de proteínas citosólicas se realiza mediante el Direct Detect (Millipore) y para

cuantificar la concentración de proteínas nucleares se usa el método de Bradford siguiendo las instrucciones del fabricante. Las fracciones de proteínas se guardaron en -80°C hasta su uso.

Para la extracción de RE y el aparato de Golgi se usa un kit comercial (Sigma endoplasmic reticulum isolation kit) y se siguen las instrucciones del fabricante. En resumen, las células se suspenden en un buffer de extracción hipotónico durante 20 minutos y después se centrifugan a 600 g y 4°C durante 5 minutos. Se descarta el sobrenadante y el pellet se suspende en el buffer de extracción isotónico. Los homogenados se centrifugan a 1000 g y a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante se somete a una serie de centrifugaciones, obteniéndose la fracción microsomal que contiene el RE y el aparato de Golgi. Se cuantifica la concentración proteica con el método de Bradford y se guardaron las muestras a -80°C hasta su uso.

3.10.2. Electroforesis, transferencia y western blot

Para electroforesis se usan los lisados celulares que contienen 10 μg (en el caso de la fracción nuclear o la fracción rica en ER y aparato de Golgi) y 15 μg (fracción citosólica). A los lisados celulares se añade el de buffer de carga (sección 3.2) y se cargan en geles de poliacrilamida de diferente porcentaje (de gradiente 4-20% o de 10%) según el peso molecular de las proteínas a analizar. Para determinar el peso molecular de las proteínas se usa un marcador de peso molecular comercial (BioRad). La electroforesis se lleva a cabo en el tampón Laemmli (sección 3.2) aplicando un voltaje constante de 200 voltios durante 35 minutos. De esta forma las proteínas se separan en función de su peso molecular y después se transfieren a una membrana de fluoruro de polivinilideno con un tampón de transferencia (sección 3.2) aplicando un voltaje constante de 10 voltios durante 30 minutos. Una vez finalizada la transferencia las membranas se guardan hasta su uso.

Las membranas se bloquean con 0,5% de BSA diluido en PBS-T y se incuban con los anticuerpos primarios (tabla 4). Después de la incubación con los anticuerpos primarios, se lavan las membranas con PBS-t y se incuban con los anticuerpos secundarios (tabla 4) y se lavan las membranas con PBS-t. Como control de carga se utiliza la laminina b1 (en el caso de las proteínas nucleares) o β -actina (en el caso de proteínas citosólicas o las proteínas de la fracción rica en ER y aparato de Golgi). La incubación de anticuerpos y los lavados con PBS-T se realizan utilizando el sistema de detección SNAP i.d. (Millipore). Para el revelado de las bandas de las proteínas de interés se utiliza el sistema de emisión de quimioluminiscencia Supersignal West Pico o Supersignal West Femto. El análisis de las bandas obtenidas por western blot se realiza usando el software Diversity GeneSnap (Syngene). En todos los casos, la proteína de interés se normaliza con la intensidad de la banda de la β -actina o de la banda de la laminina.

Tabla 4. Anticuerpos, hospedador, peso molecular y dilución utilizados para la realización de los Western Blot.

	<i>Proteína diana</i>	<i>Hospedador</i>	<i>Peso molecular (kDa)</i>	<i>Dilución</i>
<i>Anticuerpos primarios</i>	Nf- κ B p65	Conejo	65	1:10000
	Nrf2	Conejo	75	1:1000
	iNOS	Conejo	131	1:1000
	Fosfo JNK	Ratón	49	1:500
	JNK	Ratón	43/56	1:1000

	CypA	Conejo	18	1:5000
	CypB	Ratón	21	1:2000
	CypC	Conejo	23	1:1000
	CypD	Conejo	22	1:2000
	Laminina b1	Conejo	67	1:2000
	β -actina	Ratón	42	1:10000
<i>Anticuerpos secundarios</i>	Conejo	Cabra		1:5000
	Ratón	Cabra		1:5000

3.11. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE MEDIADORES INFLAMATORIOS Y CICLOFILINAS

Para la medición de los mediadores de inflamación en el medio de cultivo de las células BV-2 (IL-6 y TNF- α) y en el suero sanguíneo (IL-1 β e IL-6) se usaron kits de inmunoensayo multiplex (Milliplex®). Para la medición de los niveles de CypA, CypB, CypC and CypD en el medio de cultivo de linfocitos T humanos o en suero sanguíneo se usaron kits ELISA.

En el momento de la realización de los kits de ELISA y/o Milliplex se descongelan las muestras y se mantienen a 4°C. Los kits de ELISA/Milliplex se realizan siguiendo las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de cada analito se calcularon usando una curva estándar.

3.12. CITOMETRÍA DE FLUJO

La técnica de citometría de flujo se usó para medir la expresión del receptor CD147 en la superficie de los linfocitos T³¹⁸. Los linfocitos T se lavan dos veces con PBS + 2% de BSA y se centrifugan a 2000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se suspenden 1×10^6 células T en 50 μ L de PBS-BSA, se añaden 20 μ L de FITC anti-CD147 humano y se incuban durante 90 minutos en oscuridad, a 300 rpm y a 4°C. Después se vuelven a lavar las células dos veces con PBS y se centrifugan a 2000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se fijan las células añadiendo 100 μ L de PBS + 1% de paraformaldehído. La expresión del CD147 se analiza mediante citometría de flujo utilizando el software IDEAS ImageStream Analysis para interpretar los datos obtenidos de las medidas de la intensidad de fluorescencia.

3.13. ENSAYO DE QUIMIOTAXIS

El ensayo de quimiotaxis se empleó para evaluar la capacidad de los linfocitos T de migrar en presencia de quimioatrayentes (en este caso la CypA, CypB o ambas). Para ello, se utilizó un kit comercial de migración celular de 96 pocillos y se siguieron las instrucciones del fabricante (sección 3.1).

3.14. COCULTIVO DE CÉLULAS DE LA MICROGLÍA Y CÉLULAS NEURONALES

Para evaluar el efecto de los diferentes mediadores liberados por las células de la microglía sobre la viabilidad de las células neuronas se utilizó un sistema de cocultivo. Para el cocultivo, se utiliza la línea celular de microglía BV2 y la línea neuronal SH-SY5Y. Para ello, se siembran las células neuronales en el fondo de una placa de 24 pocillos. Sobre estos pocillos se colocan insertos que tienen una membrana semipermeable (tamaño de poro 0,4 μ m). Las células de la microglía se siembran en la superficie de los insertos (figura 22b), de esta manera, a través de la membrana semipermeable de los insertos, la microglía y las células neuronales comparten medio de cultivo, evitando el contacto directo entre ellas (figura 22c). Después de las

incubaciones con los compuestos a testar durante 24 h, se retiran los insertos celulares y se realiza el ensayo MTT (sección 3.6) para evaluar la viabilidad de las células SH-SY5Y.

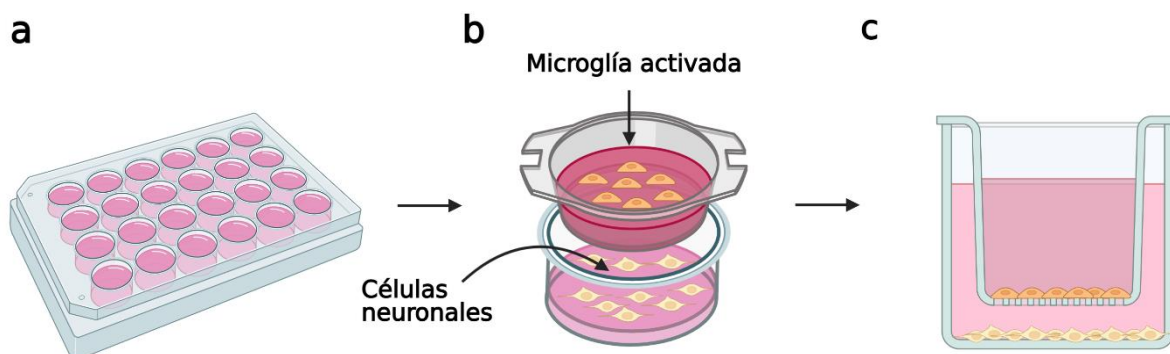


Figura 22. Sistema de cocultivo de células de la microglía y células neuronales. Las células neuronales se siembran en las placas de 24 pocillos (a). Las células de la microglía se siembran en los insertos (b). De esta forma las células comparten el ambiente a través de los poros (tamaño de poro 0,4 μm) de la membrana de los insertos, pero no están en contacto entre ellas (c).

3.15. MICROSCOPIO CONFOCAL

Para el estudio de la morfología de las células de la microglía se midieron los niveles de F- y G-actina mediante microscopía confocal. Para ello, después de la incubación con compuestos, para el marcaje de actina, las células BV2 se lavan con PBS y se fijan con paraformaldehído al 4%. Posteriormente, las células se permeabilizan con PBS-0.1% tritón X-100, 2.5% BSA durante 5 min y después, para el marcaje de F-actina se incuban con 0.165 μM de faloidina Oregon Green 514 y para el marcaje de G-actina con 0.3 μM de Texas Red DNasa I durante 20 min, seguido de lavados con PBS. Los cubreobjetos se montan en glicerol-PBS, se sellan y se almacenan a 4 $^{\circ}\text{C}$ en oscuridad hasta su visualización con el microscopio confocal.

Las imágenes se adquieren utilizando un objetivo de inmersión en aceite de 40x en un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000-E conectado al sistema confocal láser C1 (software EZC1 V.2.20; Nikon instruments Europe B.V., Países Bajos). Para excitar la faloidina Oregon Green 514 se utiliza un láser de argón de 588 nm (emite a 528 nm) y un láser de helio-neón de 561 nm para excitar la DNasa I de Texas Red (emite a 615 nm). Todos los parámetros del láser se ajustan con células control (sin ningún tratamiento) y permanecen sin cambios para el análisis posterior de las células tratadas. Las imágenes fluorescentes se adquieren a una resolución de 512 x 512 píxeles por separado para cada fluoróforo y luego se mezclan para evitar interfaces. También se comprueba que no haya interferencias de Texas Red en el canal verde ni Oregon Green en el canal rojo.

3.16. IMÁGENES

En la presente Tesis Doctoral se ha utilizado el programa BioRender para la creación de figuras y el software ChemDraw 20.0 para la creación de las estructuras químicas de los compuestos.

3.17. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para realizar el análisis estadístico se utiliza el SPSS24 para el sistema operativo Windows. En el caso del estudio de niveles de citocinas y Cyps en el suero de la sangre de pacientes, éstos se dividen en tres grupos (sujetos control, pacientes con EAC agudo y pacientes con EAC crónico). Las variables categóricas se expresan como porcentajes y las continuas como media \pm SEM. Se realizan pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para calcular la normalidad. Las medias de las variables continuas con distribución normal se comparan mediante la prueba t de Student y las que no tenían distribución normal se comparan mediante la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica. Las variables categóricas se comparan mediante la prueba de la χ^2 .

Las correlaciones (análisis bivariado) entre los niveles séricos de Cyps y/o los niveles de Cyps intracelulares en los linfocitos T se analizan mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

La concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) se calcula ajustando los datos con un modelo de log (inhibidor) vs. respuesta en el programa GraphPad Prism 7.0.

En el resto de los experimentos llevados a cabo con linfocitos T y todos los experimentos con las líneas celulares SH-SY5Y y BV2, los resultados se expresan como media \pm SEM de un mínimo de tres experimentos que se realizan por duplicado o triplicado. Las comparaciones se analizan utilizando un análisis estadístico ANOVA seguido de la prueba t de Dunnet post hoc. Los valores de $p < 0,05$ se consideran estadísticamente significativos.



4. PUBLICACIONES

En este apartado se presentan los resultados obtenidos durante la Tesis Doctoral publicados en ocho artículos en revistas internacionales. Los resultados se dividen en dos secciones. En la primera sección, se incluyen los estudios de los efectos de compuestos naturales aislados de corales y esponjas sobre modelos celulares de neuroinflamación. En la segunda sección se agrupan las publicaciones que describen las rutas intracelulares que participan en la inflamación y se estudia el papel de las ciclofilinas.

SECCIÓN I: EFECTO DE COMPUESTOS NATURALES SOBRE MODELOS CELULARES DE NEUROINFLAMACIÓN.

1. Zoanthamine alkaloids from the zoantharian *Zoanthus* cf. *pulchellus* and their effects in neuroinflammation
2. Treasures from the deep: characellides as anti-inflammatory lipoglycotriptides from the sponge *Characella pachastrelloides*
3. Bromotryptamine and bromotyramine derivatives from the tropical southwestern pacific sponge *Narrabeena nigra*
4. Futunamine, a pyrrole-imidazole alkaloid from the sponge *Stylissa* aff. *carteri* collected off the Futuna Islands

SECCIÓN II: RUTAS INTRACELULARES IMPLICADAS EN LA INFLAMACIÓN.

5. Anhydroexfoliamycin, a *Streptomyces*-secondary metabolite, mitigates microglia-driven inflammation
6. Gracilin-derivatives as lead compounds for anti-inflammatory effects
7. Cyclophilins A, B, and C Role in human T lymphocytes upon inflammatory conditions
8. Crosstalk between cyclophilins and T lymphocytes in coronary artery disease

A continuación, se presentan los artículos en inglés con una traducción de sus resúmenes en castellano.

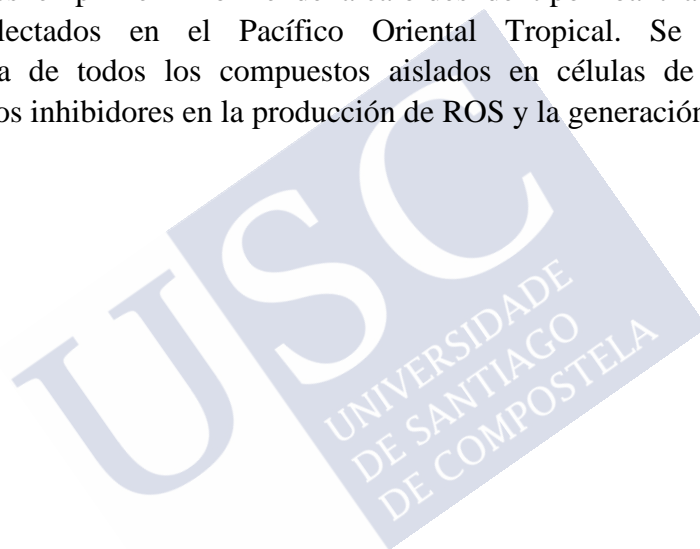


SECCIÓN I: EFECTO DE COMPUESTOS NATURALES SOBRE MODELOS CELULARES DE NEUROINFLAMACIÓN

1. Zoanthamine Alkaloids from the Zoantharian *Zoanthus cf. pulchellus* and Their Effects in Neuroinflammation

Resumen:

Se han aislado dos nuevos alcaloides de zoanthamina, a saber, 3-acetoxinorzoanthamina y 3-acetoxizoanthamina, del zoantharian *Zoanthus cf. pulchellus* recolectados frente a la costa de la península de Santa Elena, Ecuador, junto con tres derivados conocidos: zoanthamina, norzoanthamina y 3 hidroxinorzoanthamina. Las estructuras químicas de 3-acetoxinorzoanthamina y 3-acetoxizoanthamina se determinaron mediante la interpretación de sus datos 1D y 2D de resonancia magnética nuclear y la comparación con los datos de la literatura. Este es el primer informe de alcaloides de tipo zoanthamine de *Zoanthus cf. pulchellus* recolectados en el Pacífico Oriental Tropical. Se evaluó la actividad neuroinflamatoria de todos los compuestos aislados en células de microglía BV2 y se observaron efectos inhibidores en la producción de ROS y la generación de NO.



Información revista:

Zoanthamine alkaloids from the zoantharian *Zoanthus cf. pulchellus* and their effects in neuroinflammation

Paul O Guillen^{1,2}, Sandra Gegunde³, Karla B Jaramillo^{1,4}, Amparo Alfonso³, Kevin Calabro², Eva Alonso³, Jenny Rodriguez¹, Luis M Botana³, Olivier P Thomas²

¹ESPOL Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, Campus Gustavo Galindo, Ecuador.

²Marine Biodiscovery, School of Chemistry and Ryan Institute, National University of Ireland Galway, Galway, Ireland.

³Departamento de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, España.

⁴Zoology, School of Natural Sciences and Ryan Institute, National University of Ireland Galway, Galway, Ireland.

Revista: *Marine Drugs*

Fecha de publicación: 20 de julio de 2018

Enlace: <https://www.mdpi.com/1660-3397/16/7/242>

Editorial: MDPI, ST ALBAN-ANLAGE 66, CH-4052 BASEL, SWITZERLAND

ISSN: 1660-3397

Índices de calidad de la revista

Factor de impacto (2018): 4.379

Factor de impacto de 5 años (2018): 4.184

Categoría (2018): “Química Medicinal” Q1 y D1 (5/59)

Contribución doctorando

S. G. realizó los experimentos, análisis de los datos, preparación de las figuras, redacción borrador original, revisión y edición de la parte de los bioensayos.

Autorización revista/editorial

Contenido reproducido con permiso:



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

2. Treasures from the deep: Characellides as anti-Inflammatory lipoglycotriptides from the Sponge *Characella pachastrelloides*

Resumen:

La investigación química de invertebrados marinos del Atlántico nororiental profundo reveló nuevos lipoglicotripéptidos llamados characellides aislados de la esponja tetractinélida *Characella pachastrelloides*. Esta nueva familia de productos naturales presenta un tripéptido central vinculado a una unidad de azúcar rara y una cadena de alquilo larga que termina en un 2,3-dimetiltetrahidropirano. Las configuraciones de los 13 centros quirales se determinaron mediante el uso extensivo de datos de resonancia magnética nuclear y espectros de dicroísmo circular combinados con cálculos.



Información revista:

Treasures from the deep: characellides as anti-inflammatory lipoglycotriptides from the sponge *Characella pachastrelloides*

Sam Afoullouss^{1,2}, Kevin Calabro², Grégory Genta-Jouve³, Sandra Gegunde⁴, Amparo Alfonso⁴, Robert Nesbitt¹, Christine Morrow^{2,5}, Eva Alonso⁴, Luis M Botana⁴, A Louise Allcock², Olivier P Thomas¹

¹Marine Biodiscovery, School of Chemistry and Ryan Institute, National University of Ireland Galway, Galway, Ireland.

²Zoology, School of Natural Sciences and Ryan Institute, National University of Ireland Galway, Galway, Ireland.

³C-TAC, COMETE UMR 8638 CNRS, Université Paris Descartes, Paris, France.

⁴Departamento de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, España.

⁵Department of Natural Sciences, National Museums Northern Ireland.

Revista: *Organic Letters*

Fecha de publicación: 4 de enero de 2019

Enlace: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.orglett.8b03684>

Editorial: AMER CHEMICAL SOC, 1155 16TH ST, NW, WASHINGTON, DC 20036 USA

ISSN: 1523-7060

Índices de calidad de la revista

Factor de impacto (2019): 6,555

Factor de impacto de 5 años (2019): 5,858

Categoría (2019): "Química orgánica" Q1 y D1 (2/57)

Contribución doctorando

S. G. realizó los experimentos, análisis de los datos, preparación de las figuras, redacción borrador original, revisión y edición de la parte de los bioensayos.

Autorización revista/editorial

Publicación reproducida con permiso



Treasures from the Deep: Characellides as Anti-Inflammatory Lipoglycotriptides from the Sponge *Characella pachastrelloides*

Author: Sam Afoullouss, Kevin Calabro, Grégory Genta-Jouve, et al

Publication: *Organic Letters*

Publisher: American Chemical Society

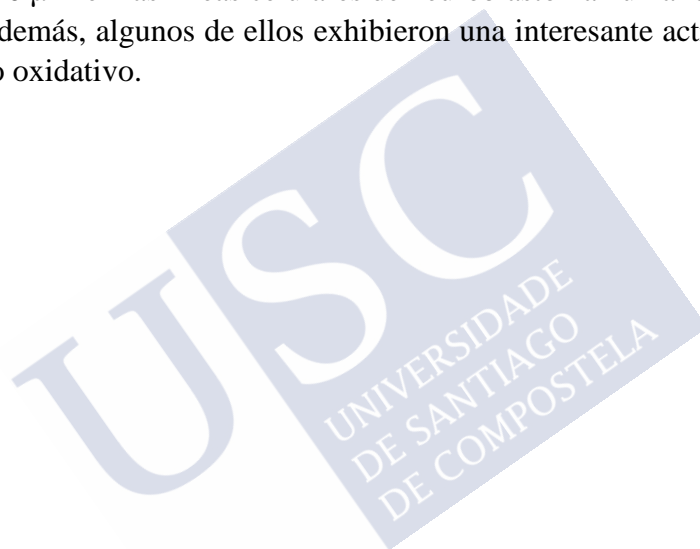
Date: Jan 1, 2019

Copyright © 2019, American Chemical Society

3. Bromotryptamine and bromotyramine derivatives from the tropical southwestern pacific sponge *Narrabeena nigra*

Resumen:

Hasta ahora, las islas Futuna ubicadas en el Océano Indo-Pacífico central no habían sido inventariadas por su diversidad de esponjas marinas y la diversidad química asociada a éstas. Como parte de la expedición del Tara Pacific, la primera investigación química de la esponja *Narrabeena nigra* recolectada alrededor de las islas Futuna arrojó 18 alcaloides bromados: siete nuevos derivados de bromotriptamina y un nuevo derivado de bromotiramina junto con 10 metabolitos conocidos de ambas familias. Sus estructuras se dedujeron de análisis exhaustivos de datos de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas de alta resolución. La anticipación de metabolitos *in silico* utilizando la herramienta en línea MetWork reveló la presencia de intermediarios biosintéticos. Estos 18 compuestos no mostraron casi ningún efecto citotóxico hasta 10 μM en las líneas celulares de neuroblastoma humano SHSY5Y y microglia BV2 de ratón. Además, algunos de ellos exhibieron una interesante actividad neuroprotectora al reducir el daño oxidativo.



Información publicación:

**Bromotryptamine and bromotyramine derivatives from the tropical southwestern
pacific sponge *Narrabeena nigra***

Maria Miguel-Gordo¹, Sandra Gegunde², Kevin Calabro¹, Laurence K Jennings¹, Amparo Alfonso², Grégory Genta-Jouve³, Jean Vacelet⁴, Luis M Botana², Olivier P Thomas¹

¹Marine Biodiscovery, School of Chemistry and Ryan Institute, National University of Ireland Galway, Galway, Ireland.

²Departamento de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, España.

³Laboratoire de Chimie-Toxicologie Analytique et Cellulaire (C-TAC) UMR CNRS 8038 CiTCoM Université Paris-Descartes, Paris, France. Muséum National d'Histoire Naturelle, Unité Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes (UMR 7245), Sorbonne Universités, CNRS, Paris, France.

⁴Aix Marseille Université, CNRS, IRD, IMBE UMR 7263, Avignon Université, Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale, Station Marine d'Endoume, Chemin de la Batterie des Lions, Marseille, France.

Revista: *Marine Drugs*

Fecha de publicación: 30 de mayo de 2019

Enlace: <https://www.mdpi.com/1660-3397/17/6/319>

Editorial: MDPI, ST ALBAN-ANLAGE 66, CH-4052 BASEL, SWITZERLAND

ISSN: 1660-3397

Índices de calidad de la revista

Factor de impacto (2019): 3.772

Factor de impacto de 5 años (2019): 4,446

Categoría (2019): “Química medicinal” Q1 (15/61)

Contribución doctorando

S. G. realizó los experimentos, análisis de los datos, preparación de las figuras, redacción borrador original, revisión y edición de la parte de los bioensayos.

Autorización revista/editorial

Contenido reproducido con permiso:



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

4. Futunamine, a pyrrole-imidazole alkaloid from the sponge *Stylissa* aff. *carteri* collected off the Futuna Islands

Resumen:

La investigación química de la esponja *Stylissa* aff. *carteri* recolectada alrededor de las islas Futuna en el Océano Pacífico condujo al aislamiento de tres nuevos alcaloides diméricos pirrol 2-aminoimidazol. Futunamine presenta un núcleo de pirrolo [1,2 c] imidazol sin precedentes, mientras que otros dos nuevos pirroles 2-aminoimidazoles diméricos se identificaron como análogos de palau'amine. Junto con otros pirroles 2-aminoimidazol conocidos aislados de esta especie, se demostró que exhiben actividades antiinflamatorias y neuroprotectoras.



Información revista:

Futunamine, a pyrrole-imidazole alkaloid from the sponge *Stylissa aff. carteri* collected off the Futuna Islands

Maria Miguel-Gordo¹, Sandra Gegunde², Laurence K Jennings¹, Grégory Genta-Jouve^{3,4}, Kevin Calabro¹, Amparo Alfonso², Luis M Botana², Olivier P Thomas¹

¹Marine Biodiscovery, School of Chemistry and Ryan Institute, National University of Ireland Galway, Galway, Ireland.

²Departamento de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, España.

³Laboratoire de Chimie-Toxicologie Analytique et Cellulaire (C-TAC) UMR CNRS 8038 CiTCoM Université Paris-Descartes, Paris, France.

⁴Laboratoire Ecologie, Evolution, Interactions des Systèmes Amazoniens (LEEISA), USR 3456, Université De Guyane, CNRS Guyane, Cayenne, French Guiana.

Revista: *Journal of Natural Products*

Fecha de publicación: 24 de julio de 2020

Enlace: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.0c00223>

Editorial: AMER CHEMICAL SOC, 1155 16TH ST, NW, WASHINGTON, DC 20036 USA

ISSN: 0163-3864

Índices de calidad de la revista

Factor de impacto (2020): 4,05

Factor de impacto de 5 años (2020): 4,603

Categoría (2020): “Farmacología y Farmacia” Q2 (106/275). “Química medicinal” Q2 (23/63). “Ciencias vegetales” Q1 (45/235).

Contribución doctorando

S. G. realizó los experimentos, análisis de los datos, preparación de las figuras, redacción borrador original, revisión y edición de la parte de los bioensayos.

Autorización revista/editorial

Contenido reproducido con permiso:

Futunamine, a Pyrrole-Imidazole Alkaloid from the Sponge *Stylissa aff. carteri* Collected off the Futuna Islands

Author: Maria Miguel-Gordo, Sandra Gegunde, Laurence K. Jennings, et al

Publication: Journal of Natural Products

Publisher: American Chemical Society

Date: Jul 1, 2020

Copyright © 2020, American Chemical Society



SECCIÓN II: RUTAS INTRACELULARES IMPLICADAS EN LA INFLAMACIÓN

5. Anhydroexfoliamycin, a *Streptomyces*-secondary metabolite, mitigates microglia-driven inflammation**Resumen:**

La anhidroexfoliamicina, un metabolito secundario de *Streptomyces*, ha mostrado propiedades antioxidantes en neuronas corticales primarias reduciendo elementos característicos de enfermedades neurodegenerativas, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. La microglía activada, en el sistema nervioso central, juega un papel crucial en la neuroinflamación y está asociada con la neurodegeneración. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar el potencial antiinflamatorio y antioxidante de la anhidroexfoliamicina sobre las células de microglía BV2. La neuroinflamación se simuló mediante la incubación de células de microglía en presencia de lipopolisacárido para activar vías de transducción proinflamatorias. Además, se utilizó un cocultivo de neuronas SH-SY5Y y células de microglía BV2 para evaluar las propiedades neuroprotectoras del metabolito *Streptomyces*. Cuando las células de la microglía se preincubaron con anhidroexfoliamicina, se inhibieron las vías proinflamatorias, como la translocación del factor nuclear κ B, la fosforilación JNK y la expresión de iNOS. Además, también se disminuyó la generación de ROS intracelulares y la liberación de NO, IL-6 y TNF- α . Asimismo, el compuesto derivado de *Streptomyces* mostró propiedades antioxidantes al promover la translocación de Nrf2 y protegiendo las células SH-SY5Y de los mediadores neurotóxicos liberados por la microglía activada. Los efectos de este compuesto estuvieron al mismo nivel que el fármaco inmunosupresor CsA. Por lo tanto, estos resultados indican que la anhidroexfoliamicina es una herramienta prometedora para controlar la inflamación impulsada por la microglía activada, mostrando un potencial terapéutico en la neuroinflamación.

Información revista:

Anhydroexfoliamycin, a *Streptomyces*-secondary metabolite, mitigates microglia-driven inflammation

Sandra Gegunde^{1,2}, Amparo Alfonso^{1,2}, Rebeca Alvariño^{1,2}, Nadia Pérez-Fuentes^{1,2}, Luis M Botana^{1,2}

¹Departamento de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, España.

²Grupo Investigación Biosdiscovery, IDIS, España.

Revista: ACS Chem Neurosci

Fecha de publicación: 10 de junio del 2021

Enlace: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscchemneuro.1c00033>

Editorial: ACS publications

ISSN: 1948-7193

Índices de calidad de la revista

Factor de impacto (2020): 4,418

Factor de impacto de 5 años (2020): 4,744

Categoría (2020): “neurociencias” Q2 (97/273) y “química medicinal” Q2 (18/63)

Contribución doctorando

S. G. realizó los experimentos, análisis de los datos, preparación de las figuras, redacción borrador original, revisión y edición.

Autorización revista/editorial

Contenido reproducido con permiso



Anhydroexfoliamycin, a *Streptomyces* Secondary Metabolite, Mitigates Microglia-Driven Inflammation

Author: Sandra Gegunde, Amparo Alfonso, Rebeca Alvariño, et al

Publication: ACS Chemical Neuroscience

Publisher: American Chemical Society

Date: Jul 1, 2021

Copyright © 2021, American Chemical Society

6. Gracilin-derivatives as lead compounds for anti-inflammatory effects

Resumen:

Las gracilinas son derivados de los diterpenos, aislados de la esponja marina *Spongionella gracilis*. Las gracilinas naturales y los derivados sintéticos han mostrado capacidades antioxidantes, inmunosupresoras y neuroprotectoras relacionadas con la afinidad por las ciclofilinas. El objetivo de este trabajo fue estudiar las vías antiinflamatorias e inmunosupresoras moduladas por gracilina L y dos análogos sintéticos, los compuestos **1** y **2**, en un modelo celular de inflamación. De esta forma, se utilizó la línea celular murina de microglía BV2. Para llevar a cabo los experimentos, se pretrataron células de microglía con compuestos durante 1 h y luego se estimularon con lipopolisacárido durante 24 h para determinar la producción de especies reactivas de oxígeno, el potencial de membrana mitocondrial, la liberación de óxido nítrico, la interleucina 6 y el factor de necrosis tumoral α y la expresión del factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2, el factor nuclear κ B, la óxido nítrico sintasa inducible y la ciclofilina A. Finalmente, se utilizó un cocultivo de neuronas SH-SY5Y y células de microglía BV2 para comprobar el efecto neuroprotector de estos compuestos. Se utilizó ciclosporina A como control del efecto antiinflamatorio. Los compuestos fueron capaces de disminuir los mediadores inflamatorios, la expresión de proteínas diana inflamatorias y también activaron mecanismos antioxidantes en condiciones inflamatorias. Por este motivo, las gracilinas naturales y sintéticas podrían resultar interesantes para desarrollar fármacos antiinflamatorios y son una herramienta útil para entender mejor el proceso inflamatorio.

Información revista:

Gracilin-derivatives as lead compounds for anti-inflammatory effects

Sandra Gegunde¹, Amparo Alfonso¹, Eva Alonso^{1,2}, Rebeca Alvariño¹, Luis M Botana¹

¹Departamento de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, España.

²Fundación Instituto de Investigación Sanitaria Santiago de Compostela (FIDIS), Hospital Universitario Lucus Augusti, Lugo, España.

Revista: *Cellular and Molecular Neurobiology*

Fecha de publicación: 15 de noviembre de 2019

Enlace: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10571-019-00758-5>

Editorial: SPRINGER/PLENUM PUBLISHERS, 233 SPRING ST, NEW YORK, NY 10013 USA

ISSN: 0272-4340

Índices de calidad de la revista

Factor de impacto (2019): 3,811

Factor de impacto de 5 años (2019): 3,126

Categoría (2019): “Biología celular” Q2 (84/193). “Neurociencias” Q2 (84/267)

Contribución doctorando

S. G. realizó los experimentos, análisis de los datos, preparación de las figuras, redacción borrador original, revisión y edición.

Autorización revista/editorial

Contenido reproducido con permiso:

Gracilin-Derivatives as Lead Compounds for Anti-inflammatory Effects

Author: Sandra Gegunde et al

Publication: Cellular and Molecular Neurobiology

Publisher: Springer Nature

Date: Nov 15, 2019

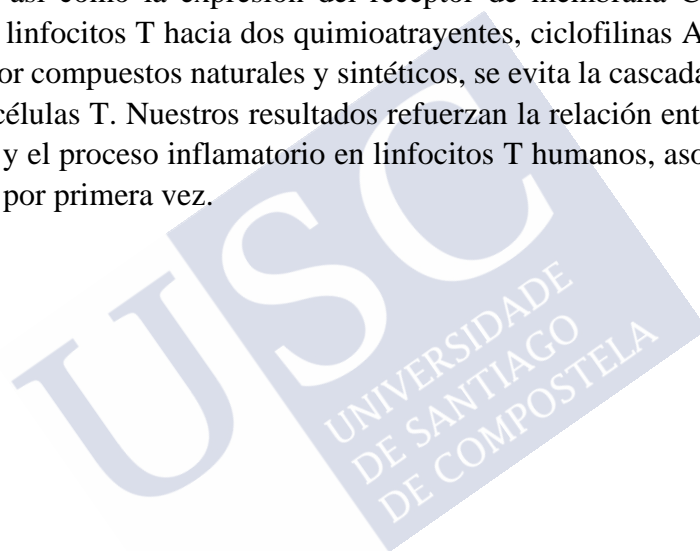
SPRINGER NATURE

Copyright © 2019, Springer Science Business Media, LLC, part of Springer Nature

7. Cyclophilins A, B and C role in human T lymphocytes upon inflammatory conditions

Resumen:

Las ciclofilinas son un grupo de peptidil-prolil *cis/trans* isomerasas que desempeñan funciones cruciales en los mecanismos reguladores de la fisiología y patología celular en varias afecciones inflamatorias. Su receptor, CD147, también participa en el desarrollo y progresión de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, la función principal de las ciclofilinas y su receptor aún no se ha descifrado. La liberación de ciclofilina A y la expresión del receptor CD147 en linfocitos T activados ya han sido descritas, sin embargo, no hay datos disponibles sobre otros ciclofilinas en estas células. Por lo tanto, en el presente trabajo se midieron los niveles de ciclofilina A, B y C intra y extracelulares bajo condiciones de inflamación. Después de la activación de los linfocitos T con concanavalina A aumentaron los niveles de ciclofilinas intra y extracelulares, así como la expresión del receptor de membrana CD147. Esto llevó a la migración de los linfocitos T hacia dos quimioatrayentes, ciclofilinas A. Cuando la ciclofilina A es modulada por compuestos naturales y sintéticos, se evita la cascada inflamatoria, incluida la migración de células T. Nuestros resultados refuerzan la relación entre las ciclofilinas A, B y C, su receptor, y el proceso inflamatorio en linfocitos T humanos, asociando la ciclofilina C con estas células por primera vez.



Información revista:

Cyclophilins A, B and C role in human T lymphocytes upon inflammatory conditions

Sandra Gegunde^{1,2}, Amparo Alfonso^{1,2}, Rebeca Alvarino^{1,2}, Eva Alonso², Luis M Botana^{1,2}

¹Departamento de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, España.

²Grupo Investigación Biosdiscovery, IDIS, España.

Revista: *Frontiers in Immunology*

Fecha de publicación: 30 de marzo de 2021

Enlace: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.609196/full>

Editorial: FRONTIERS MEDIA SA, AVENUE DU TRIBUNAL FEDERAL 34, LAUSANNE CH-1015, SWITZERLAND

ISSN: 1664-3224

Índices de calidad de la revista

Factor de impacto (2020): 7,561

Factor de impacto de 5 años (2020): 7,624

Categoría (2020): “Inmunología” Q1 (24/152).

Contribución doctorando

S. G. realizó los experimentos, análisis de los datos, preparación de las figuras, redacción borrador original, revisión y edición.

Autorización revista/editorial

Contenido reproducido con permiso:

Copyright © 2021 Gegunde, Alfonso, Alvarino, Alonso and Botana. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

8. Crosstalk between cyclophilins and T lymphocytes in coronary artery disease

Resumen:

Las enfermedades cardiovasculares y la aterosclerosis son actualmente algunas de las enfermedades más extendidas de nuestro tiempo. Dentro de las enfermedades cardiovasculares, la enfermedad de las arterias coronarias y la aterosclerosis subyacente se vincularon recientemente con la inflamación sistémica y local. Las ciclofilinas participan en el inicio y la progresión de estas enfermedades relacionadas con la inflamación. Las ciclofilinas se liberan al espacio extracelular ante estímulos inflamatorios y participan en la patología de las enfermedades cardiovasculares. El receptor de la superficie celular para las ciclofilinas extracelulares, el receptor CD147, también contribuye a la patogénesis de la enfermedad arterial coronaria. Sin embargo, la relevancia fisiológica de la familia de las ciclofilinas y su receptor en las enfermedades cardiovasculares sigue sin estar clara. El presente estudio tuvo como objetivo comprender mejor el papel de las ciclofilinas en la enfermedad arterial cardiovascular y su relación con la inflamación. Por lo tanto, se midieron ciclofilinas e interleucinas proinflamatorias en el suero de 30 sujetos (divididos en tres grupos según el estado de la enfermedad coronaria: 10 pacientes con síndrome coronario agudo, 10 pacientes con enfermedad coronaria crónica y 10 controles voluntarios sanos). Además, se midieron los niveles de ciclofilina y la expresión del receptor CD147 en linfocitos T purificados de estos sujetos. La ciclofilina A, B y C, las interleucinas proinflamatorias y la expresión de la membrana CD147 están significativamente elevadas en pacientes con enfermedad de las arterias coronarias.

Información revista:

Crosstalk between cyclophilins and T lymphocytes in coronary artery disease

Sandra Gegunde^{1,2}, Amparo Alfonso^{1,2}, Rebeca Alvariño^{1,2}, Eva Alonso², Carlos González-Juanatey³, Luis M Botana^{1,2}

¹Departamento de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, España.

²Grupo Investigación Biosdiscovery, IDIS, España.

³Carlos González-Juanatey. Grupo Investigación Biosdiscovery, IDIS, España. Servicio de Cardiología, Hospital Universitario Lucus Augusti, Lugo, España.

Revista: *Experimental Cell Research*

Fecha de publicación: 15 de marzo de 2021

Enlace: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482721000458?via%3Dihub>

Editorial: ACADEMIC PRESS INC, 525 B ST, STE 1900, SAN DIEGO, CA 92101-4495

ISSN: 0014-4827

Índices de calidad de la revista

Factor de impacto (2020): 3,905

Factor de impacto de 5 años (2020): 4,121

Categoría (2020): “Biología celular” Q3 (120/195). “Oncología” Q3 (134/242).

Contribución doctorando

S. G. realizó los experimentos, análisis de los datos, preparación de las figuras, redacción borrador original, revisión y edición.

Autorización revista/editorial

Contenido reproducido con permiso:



Crosstalk between cyclophilins and T lymphocytes in coronary artery disease

Author: Sandra Gegunde, Amparo Alfonso, Rebeca Alvariño, Eva Alonso, Carlos González-Juanatey, Luis M. Botana

Publication: Experimental Cell Research

Publisher: Elsevier

Date: 15 March 2021

© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

5. DISCUSIÓN

Actualmente la inflamación es un componente común de muchas enfermedades. En este sentido, en las últimas décadas se ha identificado el papel de la inflamación y los mediadores proinflamatorios en patología de numerosas enfermedades o desordenes crónicos, incluyendo el cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares, enfermedades autoinmunes y la artritis. Por otro lado, la inflamación también está asociada con numerosas enfermedades neurodegenerativas, entre las que se encuentran el Alzheimer, el Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y la esclerosis múltiple⁷. En este sentido, en la presente Tesis Doctoral se estudió el papel de nuevos compuestos de origen marino sobre los mediadores inflamatorios y se profundizó en las rutas implicadas en la inflamación y en las enfermedades inflamatorias, con particular interés en las Cyps.

La búsqueda de nuevos compuestos bioactivos ha despertado el interés de compuestos de origen marino en las últimas décadas. Los productos naturales marinos, son productos muy valiosos, ya que poseen estructuras químicas novedosas con diversas actividades. Además, estos productos naturales, pueden servir de base para la síntesis de nuevos compuestos con potencial terapéutico³⁴². Numerosos productos naturales se han utilizado ampliamente en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inflamación^{343, 344}. En este sentido, en la presente Tesis Doctoral se estudia el mecanismo de acción y el potencial antiinflamatorio de compuestos naturales aislados de esponjas, bacterias y cnidarios.

Las células de la microglía son las principales células inmunitarias del cerebro. La microglía puede activarse en respuesta a patógenos invasores o daños tisulares dando lugar a una respuesta inflamatoria para iniciar la reparación de los daños y la eliminación de la fuente invasora. En la mayoría de los casos este proceso es limitante y se resuelve una vez el problema esté solucionado, sin embargo, en determinadas ocasiones la inflamación se vuelve persistente y puede dar lugar a la muerte neuronal²⁵. Los TLRs están asociados con multitud de enfermedades inflamatorias relacionadas con la edad, como son la aterosclerosis, la diabetes tipo 2, la artritis reumatoide y la neuroinflamación. La microglía se puede activar a través de los TLRs o citocinas proinflamatorias, entre otras. La microglía activada desencadena la translocación del citosol al núcleo de NF- κ B y la consiguiente activación transcripcional de genes proinflamatorios que codifican citocinas proinflamatorias (como TNF- α o IL-6), seguida del inicio de la cascada inflamatoria³⁴⁵. El LPS, un componente de la membrana externa de las bacterias gram negativas se usa para activar la respuesta inflamatoria a través la activación de TLR4. De esta forma se estimula la translocación del citosol al núcleo del NF- κ B, lo que conduce a la expresión de genes implicados en los procesos inflamatorios³⁴⁶. En este sentido, para testar el potencial antiinflamatorio de compuestos naturales, se utilizaron las células BV2 de microglía activadas con LPS.

Las zoanthaminas, son alcaloides aislados del cnidario *Zoanthus cf. pulchellus*. En la presente Tesis Doctoral se hizo un screening inicial del potencial antiinflamatorio de 5 alcaloides

derivados de zoanthamina. Para ello, se usó la línea celular BV2 activada con LPS. En este sentido, la inflamación y la activación de la microglía promueven el estrés oxidativo y el daño del ADN que conduce a la sobreproducción de ROS. Las ROS además de causar citotoxicidad directa, también desencadena la activación de vías proinflamatorias. Las mitocondrias son la principal fuente de ROS, y la producción excesiva de ROS en la cadena de transporte de electrones o el deterioro de la defensa antioxidante causa disfunción mitocondrial y el inicio de la muerte celular, lo que contribuye con la neurodegeneración³⁴⁷. Además, la microglía activada en condiciones inflamatorias no solo aumenta la producción de ROS, sino que también la liberación de NO al medio. En estas condiciones, el NO se convierte en un radical libre tóxico que exacerba la inflamación tisular e induce la apoptosis celular, el estrés oxidativo y el deterioro neuronal^{348, 349}. Por este motivo se midió la producción intracelular de ROS y la liberación de NO en presencia de los derivados de zoanthamina²³. Estos compuestos han mostrado buenos resultados modulando la producción intracelular de ROS y la liberación de NO al medio por parte de la microglía activada. Primeramente, se evaluó la viabilidad celular en presencia de los compuestos y ninguno mostró citotoxicidad hasta 10 μM . Todas las zoanthaminas reducen la generación de ROS desde al menos 0,1 μM , siendo la más potente la 3-acetoxinorzoanthamina que es capaz de inhibir la producción de ROS desde 0,001 μM (tabla 5). Además, los 5 compuestos muestran una actividad similar disminuyendo la liberación de NO a 1 y 0,1 μM . Algunas zoanthaminas habían mostrado actividad antiinflamatoria en un modelo inflamatorio con neutrófilos humanos³⁵⁰. Sin embargo, de los 5 alcaloides testados en la presente Tesis Doctoral, es la primera vez que se muestran resultados sobre la actividad biológica de dos compuestos derivados de la zoanthamina (3-acetoxizoanthamina y 3-acetoxinorzoanthamina). Estos resultados están recogidos en la publicación “Zoanthamine alkaloids from the zoantharian *Zoanthus cf. pulchellus* and their effects in neuroinflammation”.

Tabla 5. Resumen de los resultados obtenidos con las zoanthaminas (*Zoanthus cf. pulchellus*) en la línea celular de microglía BV2

ZOANTHAMINAS (<i>Zoanthus cf. pulchellus</i>)	Reducción producción ROS	Reducción liberación NO
ZOANTHAMINA	0,1 μM	1-0,1 μM
NORZOANTHAMINA	0,1 μM	1 μM
3-HIDROXINORZOANTHAMINA	0,1 μM	1-0,1 μM
3-ACETOXIZOANTHAMINA	0,01 μM	1-0,1 μM
3-ACETOXINORZOANTHAMINA	0,001 μM	1 μM

La characellide A y characellide B aisladas de la esponja *Characella pachastrelloides* son compuestos nuevos de los que se desconoce su bioactividad. Por este motivo, se testaron en el modelo de inflamación anteriormente usado (células BV2 activadas con LPS). Del mismo modo que con las zoanthaminas, también se midieron los niveles de ROS y liberación de NO por parte de la microglía activada en presencia de las characellides. Se observó que las characellides A y B son capaces de disminuir la producción de ROS (desde 1 y 0,01 μM respectivamente), sin embargo, no producen efectos significativos sobre la liberación de NO al medio (resultados resumidos en la tabla 6). Con el fin de aclarar el mecanismo de acción de las characellides, se midió el potencial de membrana mitocondrial, ya que el aumento en la producción de ROS está relacionado con variaciones en el potencial de la membrana mitocondrial²⁶⁰. Cuando las células

de la microglía se tratan con LPS, aumenta el potencial de membrana mitocondrial. En presencia de las characellides, se percibe una disminución del potencial de membrana mitocondrial hasta valores control. Por lo tanto, las characellides son capaces de disminuir la producción de ROS, probablemente mediante un mecanismo relacionado con la mitocondria y no con el NO, sin mostrar citotoxicidad. Además, la characellide B ha mostrado mayor potencia que la characellide A manteniendo el potencial de membrana mitocondrial y reduciendo la generación de ROS. Estos resultados están recogidos en la publicación “Treasures from the deep: characellides as anti-inflammatory lipoglycotriptides from the sponge *Characella pachastrelloides*”.

Tabla 6. Resumen de los resultados obtenidos con las characellides (*Characella pachastrelloides*) en la línea celular de microglía BV2

CHARACELLIDES (<i>Characella pachastrelloides</i>)	Reducción producción ROS	Reducción $\Delta\Psi_m$
CHARACELLIDE A	1 μM	1 μM
CHARACELLIDE B	0,01 μM	0,001 μM

Las futunas son metabolitos secundarios aislados de la esponja *Narrabeena nigra*. En este sentido se han aislado 18 compuestos (alcaloides bromados) de los que se desconoce su mecanismo de acción. Estos compuestos han sido testados en dos modelos celulares de inflamación y neuroinflamación. En este sentido, se usaron las líneas celulares de neuroblastoma humano SH-SY5Y y de microglía BV2, ya que son ampliamente utilizadas para para estudios biológicos de neuroinflamación y neuroprotección^{351, 352}. Por lo tanto, para evaluar los efectos neuroprotectores de estos compuestos, se utilizó TBHP para inducir daño oxidativo en las células neuronales, y se utilizó la vitamina E como control de los efectos neuroprotectores y antioxidantes. 9 de los 18 alcaloides bromados mostraron un interesante efecto neuroprotector contra el daño oxidativo inducido por TBHP en las células SH-SY5Y, de la misma manera que la vitamina E antioxidante (desde 0,001 o 1 μM ; resultados resumidos en la tabla 7). Por otro lado, también se evaluó el efecto de los 9 alcaloides bromados que mostraron potencial neuroprotector sobre la liberación de NO por parte de la microglía activada, ya que este mediador inflamatorio es neurotóxico y puede llegar a causar la muerte neuronal³⁵³. 7 de los 9 alcaloides bromados testados sobre la microglía activada fueron capaces de disminuir la liberación de NO al medio. Además, ninguno de estos compuestos ha mostrado citotoxicidad sobre las neuronas ni sobre la microglía. Todos estos resultados sugieren el potencial neuroprotector y antioxidante de estos productos naturales. Estos resultados están recogidos en la publicación “Bromotryptamine and bromotyramine derivatives from the tropical southwestern Pacific sponge *Narrabeena nigra*”.

Tabla 7. Resumen de los resultados obtenidos con las futunas (*Narrabeena nigra*) en la línea celular de microglía BV2 y SHSY5Y.

FUTUNAS (<i>Narrabeena nigra</i>)	NEUROPROTECCIÓN (neuronas)	Reducción liberación NO (microglía)
5,6-DIBROMO-N,N,N-DIMETILOXIDETRIPTAMINA	0,01-0,1 μ M	-
5,6-DIBROMOKIMURAMINA	0,001 μ M	-
5,6-DIBROMO-N-METILTRIPTAMINA	0,001 μ M	0,1-1 μ M
5,6-DIBROMOTRIPTAMINA	0,1 μ M	0,1 μ M
6-BROMO-N-METILTRIPTAMINA	0,1 μ M	0,1 μ M
6-BROMOTRIPTAMINA	1-10 μ M	0,1-1 μ M
6-BROMOQUINURAMINA	0,1-1 μ M	0,1 μ M
7-BROMOQUINOLIN-4(1H)-ONA	1-10 μ M	0,1 μ M
3,5 DIBROMO-4-METOXITIRAMINA	0,1 μ M	1 μ M

La esponja *Stylissa aff. carteri* ha dado lugar a 7 alcaloides pírrolo imidazol, denominados futunamides, de los cuáles 3 compuestos se han aislado por primera vez, de los que no se sabe nada acerca de su mecanismo de acción. Los otros 4 alcaloides ya se habían aislado con anterioridad (la esceptrina, la manzacidina A, la himenidina y la oroidina), sin embargo, sus efectos antiinflamatorios y/o neuroprotectores nunca habían sido probados^{327, 329, 330}. Por este motivo, la actividad antiinflamatoria y neuroprotectora de todos los alcaloides aislados se probaron en dos modelos celulares anteriormente descritos, el neuroblastoma humano SH-SY5Y y la microglía BV2. En este sentido el TBHP se usó para inducir neurotoxicidad y daño oxidativo (aumento de la producción de ROS) en las células neuronales. El TBHP reduce la viabilidad celular en las neuronas, sin embargo, en presencia de la manzacidina A, la himenidina y la oroidina se observó una reducción de la muerte neuronal desde al menos 0,01 μ M. La futunamina también es capaz de evitar la muerte neuronal en presencia de TBHP a 10 μ M (resultados resumidos en tabla 8). Sin embargo, el resto de los alcaloides no mostraron efectos protectores sobre la toxicidad inducida por el TBHP. El siguiente paso fue comprobar si estos compuestos modulan la producción de ROS. Para ello, también se usó el TBHP para estimular la producción de ROS por parte de las neuronas. Se observó que varios compuestos (la manzacidina A, la himenidina, la futunamina y la debromokonbuacidina) disminuyen la producción de ROS (desde 0,001 μ M) hasta casi los mismos niveles que la vitamina E usada como control antioxidante. Además, la debromokonbuacidina, la didebromocartermamina y la himenidina son los únicos compuestos capaces de disminuir la liberación de NO al medio (a 1 y 0,1 μ M) en células de la microglía activadas. Por lo tanto, algunos de estos compuestos han revelado propiedades antiinflamatorias y neuroprotectoras, siendo la himenidina el compuesto más activo. Asimismo, ninguno de estos compuestos ha mostrado citotoxicidad sobre la línea celular neuronal ni de microglía. Estos resultados están recogidos en la publicación "Futunamine, a pyrrole-imidazole alkaloid from the sponge *Stylissa aff. carteri* collected off the Futuna Islands".

Tabla 8. Resumen de los resultados obtenidos con las futunaminas (*Stylissa aff. carteri*) en la línea celular de microglía BV2 y SHSY5Y

FUTUNAMINAS (<i>Stylissa aff. carteri</i>)	NEUROPROTECCIÓN (neuronas)	Reducción producción ROS (neuronas)	Reducción liberación NO (microglía)
FUTUNAMINA	10 μ M	0,001 μ M	-
DEBROMOKONBUACIDINA	-	0,001 μ M	-
DIDEBROMOCARTERAMINA	-	-	0,1-1 μ M
MANZACIDINA A	0,001-0,01 μ M	0,001-1 μ M	-
HIMENIDINA	0,001 μ M	0,001-1 μ M	0,1-1 μ M
OROIDINA	0,001 μ M	-	-
ESCEPTRINA	-	-	1 μ M

En resumen, muchos de los compuestos testados (zoanthaminas, characellides, futunas y futunamides) han mostrado actividades antiinflamatorias, antioxidantes y neuroprotectoras. Considerando que la inflamación y el estrés oxidativo son componentes comunes de la neuroinflamación y las enfermedades neurodegenerativas, estos compuestos tienen potencial como fármacos protectores en los procesos de neuroinflamación²⁸. Estos resultados preliminares obtenidos son prometedores. De esta forma se destaca el enorme potencial de la biodiversidad de las profundidades marinas en el descubrimiento de nuevos compuestos con actividades interesantes. Sin embargo, más estudios son necesarios para aclarar el mecanismo de acción de estos compuestos.

Las bacterias del género *Streptomyces* sp. (Filo Actinobacteria) han contribuido al desarrollo de dos tercios de los antibióticos utilizados actualmente y además son productores de metabolitos secundarios de gran interés^{237, 256}. El hiperárido Desierto de Atacama (Chile) es una fuente de metabolitos secundarios de *Streptomyces* sp., incluida la anhidroexfoliamicina utilizada en el presente estudio^{354, 355}. La anhidroexfoliamicina ha mostrado interesantes propiedades antioxidantes, neuroprotectoras y antialzheimer²⁶⁰. Además, ha manifestado efectos protectores contra la enfermedad de Alzheimer en un modelo *in vivo* de ratón²⁶¹. Teniendo en cuenta los resultados prometedores de este compuesto en los trastornos neurodegenerativos, se estudió su efecto sobre otras células implicadas en estas patologías, las células de la glía, ya que este compuesto nunca se ha estudiado en modelos inflamatorios. Para este propósito se testó la anhidroexfoliamicina en las células BV2 de microglía de ratón activadas con LPS. En este sentido, primeramente, se estudió el efecto de la anhidroexfoliamicina sobre los niveles de ROS. Este compuesto redujo los niveles de ROS inducidos por el LPS en las células BV2 hasta valores control. Además, varios estudios han descrito que la respuesta inflamatoria inducida por LPS en la microglía está directamente relacionada con la sobreproducción de ROS y, mediante la reducción directa de la liberación de ROS, se inhibe la respuesta inflamatoria^{356, 357}. Por lo tanto, la inhibición de ROS puede conducir también a una reducción de la respuesta inflamatoria. Como se ha mencionado anteriormente, en la microglía activada está aumentada la liberación de NO. Este NO está inducido por la enzima iNOS³⁴⁸. Por lo tanto, se estudió la expresión de iNOS y la liberación de NO al medio en presencia de la anhidroexfoliamicina. En las células de la microglía activada, el metabolito secundario de *Streptomyces* fue capaz de reducir tanto los niveles de iNOS como la liberación de NO, lo que sugiere un potencial antiinflamatorio y neuroprotector. En este sentido, se ha demostrado que la silenciación de iNOS tiene efectos neuroprotectores en modelos *in vivo* de Parkinson, reduciéndose la activación microglial³⁵⁸.

Como se mencionó anteriormente, el LPS actúa a través del TLR4 y activa una cascada inflamatoria, induciendo vías proinflamatorias como el NF- κ B. La activación de este factor de transcripción en las células de la glía provoca la activación del fenotipo M1 proinflamatorio, dando lugar a la neuroinflamación^{359, 360}. Además, la translocación de NF- κ B del citosol al núcleo induce la liberación de citocinas proinflamatorias como el TNF- α e IL-6³⁶¹. Los niveles de estas citocinas están aumentados en enfermedades neurodegenerativas y se relacionan con el daño neuronal y la neuroinflamación²⁸. Por consiguiente, se estudiaron los niveles de NF- κ B y TNF- α e IL-6 en la microglía activada. Se observó que la anhidroexfoliamicina reduce la translocación al núcleo de NF- κ B, así como la liberación de TNF- α e IL-6. Probablemente, la liberación de estas citocinas proinflamatorias está mediada por la inhibición de NF- κ B. Desde este punto de vista, la anhidroexfoliamicina muestra propiedades interesantes, ya que varios estudios han demostrado que la modulación del fenotipo de la microglía a través de la inhibición de NF- κ B tiene efectos neuroprotectores^{362, 363}. Por tanto, la inhibición de NF- κ B por parte de la anhidroexfoliamicina podría fomentar el cambio fenotípico de M1 proinflamatorio al M2 antiinflamatorio. Además, los mediadores proinflamatorios estimulados por NF- κ B, como TNF- α e IL-6, provocan una alteración de las barreras hematoencefálicas, lo que permite que los linfocitos ingresen al cerebro exacerbando la respuesta inflamatoria del SNC³⁶⁴.

Por otro lado, los factores de transcripción NF- κ B y Nrf2 en la microglía son moduladores de sus respuestas proinflamatorias y antioxidantes, respectivamente. Nrf2 es un factor de transcripción sensible a redox, que activa genes y enzimas antioxidantes y citoprotectores en condiciones oxidativas³⁶⁵. Por lo tanto, dado los resultados anteriores, se estudió la translocación del citosol al núcleo de Nrf2. Se observó que la anhidroexfoliamicina promueve la translocación de Nrf2, mientras que, como se describió anteriormente, inhibe la translocación de NF- κ B. Estos resultados concuerdan con estudios previos, ya que la anhidroexfoliamicina había mostrado interesantes actividades neuroprotectoras y antioxidantes en neuronas²⁶⁰. Numerosos estudios han revelado la capacidad antioxidante de muchos compuestos *in vitro*, sin embargo en la mayoría de los estudios *in vivo* no mostraron efectos neuroprotectores o antiinflamatorios³⁶⁶. Esta ineficacia en modelos animales se atribuye a la inestabilidad de los compuestos o la dificultad que presenta a la hora de llegar a las células cerebrales³⁴⁷. Los efectos beneficiosos que ha mostrado la anhidroexfoliamicina en roedores con Alzheimer indican que este compuesto es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica *in vivo*²⁶¹.

Además de la vía NF- κ B, en la inflamación del SNC, también se activa la vía de señalización MAPK en las células de la microglía. Esta vía puede estar activada por estímulos estresantes y mediadores proinflamatorios como TNF- α , dando lugar a la inducción de ERK1/2, JNK o p38³⁶⁷. Entre ellos, JNK participa en la activación de la microglía y es responsable de la fosforilación de tau en el Alzheimer²⁵⁸. Consecuentemente, cuando se midió la fosforilación de JNK en las células de la microglía activada, se observó que su fosforilación se reduce en presencia de la anhidroexfoliamicina. Estos resultados sugieren que JNK es una diana molecular importante de este compuesto. Además, la inhibición de la fosforilación de JNK previene la fosforilación de tau, la disfunción sináptica y la respuesta inflamatoria inducida por la microglía hiperactivada³⁶⁸. Para seguir dilucidando el mecanismo de acción de la anhidroexfoliamicina en la inflamación y la liberación de factores neurotóxicos, se probó el compuesto en un sistema de cocultivo con células de la microglía y células neuronales. Cuando la microglía se trata con LPS, los mediadores liberados por ésta inducen la muerte de las

neuronas. En este sentido, se observó que la anhidroexfoliamicina es capaz de inhibir los mediadores neurotóxicos liberados por la microglía activada y proteger a las neuronas. Numerosos estudios han demostrado que las moléculas capaces de evitar la liberación de mediadores proinflamatorios en la microglía tienen un potencial terapéutico contra enfermedades neuroinflamatorias^{28, 369}. Estos resultados refuerzan el papel antiinflamatorio y neuroprotector del compuesto.

Cuando se activa la microglía, además de liberar mediadores proinflamatorios, también se altera su morfología^{370, 371}. Cuando las células de la microglía se trataron con LPS sufrieron cambios morfológicos y el citoplasma se expandió con la formación de filopodios, lo que es característico del fenotipo M1 proinflamatorio³⁷¹. Sin embargo, en presencia de la anhidroexfoliamicina el tamaño citoplasmático y la forma de las células vuelven a los de las células control.

Como se describió anteriormente, después de la estimulación, la microglía puede cambiar su fenotipo entre proinflamatorio M1 e inmunosupresor M2²⁵. En este contexto, la capacidad de la anhidroexfoliamicina para minimizar los cambios morfológicos de la microglía activada con LPS, además de los efectos inflamatorios mostrados en este estudio, sugieren que este compuesto puede cambiar la polarización de la microglía al fenotipo inmunosupresor. Igualmente, estudios recientes han señalado que la inducción de la activación del fenotipo M2 es un objetivo prometedor en el contexto de enfermedades neurodegenerativas³⁶². Por otro lado, a partir de los resultados en el cocultivo de microglía y neuronas, se demostró que la anhidroexfoliamicina previene la neurotoxicidad. Al inhibir los mediadores proinflamatorios liberados por la microglía activada, este compuesto puede prevenir la muerte de las células neuronales causada por la neuroinflamación. Algunos compuestos derivados de *Streptomyces* también han mostrado efectos antiinflamatorios similares, como en el caso de la violacina A³⁷². Estos resultados están recogidos en la publicación “Anhydroexfoliamycin, a *Streptomyces* secondary metabolite, mitigates microglia-driven inflammation”.

Por lo tanto, estos compuestos aislados a partir de esponjas o de un coral han mostrado interesantes actividades antiinflamatorias y neuroprotectoras, en especial la anhidroexfoliamicina. Posteriormente, se siguió investigando las rutas inflamatorias. En este sentido, en las últimas décadas, las Cyps y en especial la CypA han destacado por su participación en los procesos inflamatorios. Sin embargo, las funciones exactas de estas proteínas no están claras^{125, 146}. Por otro lado, se ha observado que algunos compuestos derivados de la esponja *Spongionella gracilis*, las gracilinas, son capaces de unirse a la CypA y además mostraban actividad antiinflamatoria^{317, 373}. Por esta razón, en la presente Tesis Doctoral se profundizó en el estudio de las rutas inflamatorias, así como el papel de las Cyps en la inflamación y como afecta su modulación con la gracilina natural GraL y dos análogos sintéticos.

Las gracilinas son metabolitos secundarios obtenidos de esponja *Spongionella gracilis*, que han mostrado efectos neuroprotectores, antioxidantes y/o antiinflamatorios^{315, 317, 318}. Algunas gracilinas que han mostrado afinidad de unión hacia la CypA, tienen actividad inmunomoduladora, ya que reducen la liberación de la IL-2 al medio a través de la inhibición de NFATc1 y de la actividad de la calcineurina en linfocitos T activados³¹⁸. En concreto, la GraL ha mostrado una afinidad hacia la CypA en el rango nM, del mismo modo que el fármaco inmunosupresor CsA (tabla 9)³⁷³. La CsA ejerce sus efectos inmunosupresores y

antiinflamatorios a través la modulación de CypA³⁷⁴. Además, la GraL también inhibe más de un 70% la liberación de la IL-2 al medio y un 10% la actividad de la calcineurina, casi al mismo nivel que la CsA (tabla 9). De la misma forma, dos análogos sintéticos de la GraA, el compuesto **1** y el compuesto **2**, también se unen de forma selectiva a la CypA, presentando actividad antiinflamatoria e inmunosupresora. Estos análogos sintéticos, tienen una afinidad de unión con la CypA similar a la CsA, además también inhiben la actividad de la calcineurina y la liberación de IL-2 al medio (tabla 9)³¹⁹. Sin embargo, no se conocían las vías intracelulares mediadas por los dos compuestos sintéticos en la inflamación. Por lo tanto, en la presente Tesis Doctoral se investigó el papel del compuesto **1** y el compuesto **2** sobre los procesos inflamatorios y su mecanismo de acción. La GraL se usó como compuesto natural de referencia para la actividad antiinflamatoria e inmunosupresora.

Tabla 9. Valores de K_D para la unión de los compuestos con la CypA, inhibición de la actividad de la calcineurina fosfatasa expresada en porcentaje de células control y la inhibición de la liberación de IL-2 expresada en porcentaje de células control. Estos experimentos fueron hechos en linfocitos T humanos activados

	K_D (nM)	INHIBICIÓN CALCINEURINA (%)	INHIBICIÓN LIBERACIÓN IL-2 (%)
GRACILINA L	24.85 ± 6.83	≈ 10	71.8 ± 11.6
COMPUESTO 1	5.34 ± 1.68	22.3 ± 6.1	44.5 ± 2.15
COMPUESTO 2	7.67 ± 1.61	31.0 ± 3.4	36.1 ± 5.9
CSA	6.83 ± 1.1	17.3 ± 4.5	66.75 ± 8.25

En la modulación de la respuesta inflamatoria, como se ha mencionado anteriormente, existen varias vías de señalización intracelular. Una de las moléculas de señalización más importantes implicadas en la producción de citocinas proinflamatorias y mediadores es la vía NF- κ B. Además, NF- κ B es el principal objetivo farmacológico en varias enfermedades, debido a su papel clave en una variedad de patologías²⁸. En este sentido, tanto la GraL como los compuestos **1** y **2** han sido capaces de inhibir la translocación al núcleo del NF- κ B. Además, estos compuestos también han sido capaces de inhibir la liberación de mediadores proinflamatorios como el NO, el TNF- α y la IL-6. Tanto el TNF- α como la IL-6 están muy relacionados con el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas y son capaces de activar la transcripción de genes proinflamatorios como iNOS, que a su vez estimula la producción de NO³⁶⁹. Por otro lado, la activación de la translocación de NF- κ B al núcleo puede estimular la producción y liberación de TNF- α y de IL-6 y a su vez, estas citocinas también pueden activar la ruta de NF- κ B³⁴⁸. Por lo que la reducción en la translocación de NF- κ B por la GraL y los compuestos **1** y **2** puede estar mediada por la inhibición de la liberación de TNF- α y de IL-6 o viceversa.

Normalmente, una respuesta inflamatoria va acompañada de una sobre producción de ROS. Inicialmente las ROS son moléculas importantes para mantener la homeostasis celular, sin embargo, una producción excesiva de estas conduce a un estado de estrés oxidativo que puede contribuir al desarrollo de eventos fisiopatológicos como la inflamación crónica³⁷⁵. Además, la expresión de moléculas proinflamatorias como la iNOS está relacionada con la producción de ROS²⁵⁸. Una forma de proteger a las células del daño inflamatorio es reducir la generación de ROS mediante la estimulación de la translocación de Nrf2. La activación de Nrf2 tiene propiedades antioxidantes y es importante para la defensa celular, ya que tiene un efecto

protector contra el daño oxidativo y la inflamación³⁷⁶. Además, la activación de Nrf2 inhibe la translocación de NF- κ B, por lo que los compuestos capaces de potenciar la activación de Nrf2 son excelentes candidatos para el desarrollo de fármacos antiinflamatorios³⁷⁷. En este sentido, la GraL y los compuestos **1** y **2** son capaces de reducir la producción de ROS y de activar la translocación de Nrf2 del citosol al núcleo, junto con la inhibición de la ruta de NF- κ B.

La liberación de los mediadores proinflamatorios, inducidos por el LPS en la microglía, son neurotóxicos. Por lo tanto, en vista a los resultados anteriores, se testaron los compuestos sobre un modelo de cocultivo celular, con líneas celulares de microglía y neuronas. Como se ha mencionado anteriormente, la microglía activada libera mediadores neurotóxicos. Sin embargo, cuando la microglía es activada con LPS en presencia de los compuestos se reduce la muerte neuronal, ya que son capaces de inhibir la liberación de mediadores neurotóxicos por parte de la microglía. Cuando se reduce la inflamación mediada por la microglía también se reduce el daño neuronal³⁷⁸. Consecuentemente, nuestros resultados demuestran que los compuestos derivados de *Spongionella* sp. modulan la inflamación y tienen propiedades neuroprotectoras.

Los efectos antiinflamatorios de GraL y los compuestos **1** y **2** siempre se compararon con los efectos de CsA a lo largo de los experimentos mencionados anteriormente. La CsA es un oligopéptido cíclico no polar, producido por el hongo *Tolypocladium inflatum*, que se usa ampliamente para evitar el rechazo post trasplante y en desordenes autoinmunes, ya que es una molécula inmunosupresora y antiinflamatoria²³⁵. Este fármaco inmunosupresor inhibe la proliferación, diferenciación y activación de las células T al bloquear la actividad de la calcineurina mediante la formación del complejo CsA-CypA³⁷⁹. Además, la CsA evita la apertura del mPTP a través de su unión con CypD. Sin embargo, el uso de la CsA es limitado, ya que produce toxicidad en el páncreas, el riñón y el sistema nervioso central, además de poseer baja solubilidad y una ventana terapéutica estrecha^{235, 380}. Por otro lado, aunque este fármaco evita la apertura del mPTP, un tratamiento crónico con CsA induce una sobreproducción de ROS intracelular y aumenta el potencial de membrana mitocondrial³⁷⁹. En este sentido, la GraL y los compuestos **1** y **2** podrían ser una alternativa al uso de CsA, ya que estos compuestos han mostrado una menor citotoxicidad tanto en la presente Tesis Doctoral como en estudios anteriores *in vitro* e *in vivo*^{315, 316, 373}. Por otro lado, la GraL y los dos análogos sintéticos muestran una afinidad de unión hacia la CypA e inhiben la liberación de CypA al medio en el mismo rango que la CsA^{317, 319}. La CypA intracelular participa en numerosos procesos celulares, como la regulación transcripcional, señalización celular, tráfico y plegamiento de proteínas. Además, la CypA es capaz de activar la producción de citocinas proinflamatorias y su sobreproducción está relacionada con patologías con base inflamatoria^{152, 161}. Asimismo, en el presente estudio la GraL y los compuestos **1** y **2** redujeron la expresión intracelular de CypA en condiciones de inflamación. En consecuencia, además de unirse a CypA, también modulan la actividad de CypA, mostrando una interesante actividad en inmunosupresión e inflamación. Sin embargo, aunque CsA se une a CypA y bloquea su liberación al medio, es incapaz de reducir la expresión de CypA intracelular. Estos resultados están recogidos en la publicación “Gracilin-derivatives as lead compounds for anti-inflammatory effects”.

Para seguir dilucidando el mecanismo de acción y los efectos de la modulación de la CypA de la GraL y los dos análogos sintéticos se utilizaron linfocitos T en condiciones de inflamación. En este sentido, los linfocitos T humanos se activaron con la convanavalina A (Con A), una

lectina vegetal que tiene propiedades proinflamatorias y a través del receptor de antígeno activa los linfocitos T. Además, la Con A estimula la expresión y liberación de CypA, así como la migración en linfocitos T^{318, 381}. Cuando se trataron los linfocitos T con la Con A no solo aumentó la liberación y expresión intracelular de CypA, sino que también de la CypB y CypC, descrito por primera vez en la presente Tesis Doctoral. De esta forma parece que las CypB y CypC también juegan un papel en el proceso inflamatorio, ya sea directa o indirectamente. También cabe destacar que mientras la CypA y CypB intracelulares se detectaron en el citosol, la CypC tiene una localización diferente, ya que solo se encontró en lisados de fracciones microsomales que contiene el RE y el aparato de Golgi. Esto coincide con estudios anteriores, donde la CypC se ha asociado con el RE en células de hepatoma humano y renal^{189, 382, 383}. Es preciso señalar que no se encontraron diferencias en la expresión de CypD intracelular cuando se tratan los linfocitos T con Con A. De esta forma, teniendo en cuenta la actividad antiinflamatoria mostrada por el compuesto natural GraL y los compuestos **1** y **2**, se testaron sobre este modelo de inflamación (linfocitos T activados con Con A). En este sentido, se estudió los efectos de estos compuestos sobre los niveles de las CypA, CypB y CypC en los linfocitos T activados. De tal manera, los tres compuestos fueron capaces de reducir la liberación de las tres Cyps además de inhibir su expresión intracelular, a excepción de la GraL que no fue capaz de reducir la expresión intracelular de CypC. Por otro lado, como se mencionó anteriormente, como la CypA parece jugar una función esencial en el proceso inflamatorio, también se utilizó la CsA para comparar los resultados sobre la modulación de las Cyps, ya que se sabe que los efectos inmunosupresores de la CsA son a través de su unión con la CypA³⁸⁴. La CsA también redujo los niveles intra y extracelulares de CypA y CypB, sin embargo, fue el compuesto que mostró menor efecto reduciendo los niveles de CypC. En este sentido, tanto la GraL como los análogos sintéticos manifestaron propiedades más prometedoras a la hora de modular las Cyps en condiciones de inflamación que la CsA.

Aparte de la relevancia de la CypA intracelular en las funciones de señalización, tráfico y plegamiento de proteínas, la CypA extracelular también tiene un papel significativo en los procesos inflamatorios. La CypA extracelular es una citocina proinflamatoria que fomenta la inflamación en varios tipos celulares. Esta inmunofilina promueve la migración y proliferación de leucocitos y VSMCs, además de estimular la liberación de IL-1 β , IL-6 e IL-8 en células como macrófagos y monocitos^{157, 161}. Por otro lado, también induce la apoptosis de células endoteliales, la expresión de moléculas de adhesión, promoviendo la adhesión plaquetaria y fomentando enfermedades como la aterosclerosis. Además, la CypA extracelular también induce la activación de varias rutas inflamatorias, ya que activa la ruta del NF- κ B, ERK1/2, JNK y p-38 MAPKs^{122, 161}. La CypB extracelular también parece desempeñar una función importante en la mediación de la inflamación. Además, la CypB promueve la adhesión de las plaquetas al colágeno²⁰⁰. De esta forma, la inhibición de la liberación de la CypA y CypB por parte de la GraL y los análogos sintéticos, los convierten en compuestos interesantes para la prevención de la respuesta inflamatoria en diferentes tipos celulares implicadas en la respuesta inflamatoria, además de en las células T. Aparte de las funciones de la CypA y CypB extracelulares ya mencionadas, también se sabe que actúan como moléculas quimioatrayentes de células inflamatorias activadas³⁸⁵. En la presente Tesis Doctoral, también se observó que tanto la CypA como la CypB extracelulares, son capaces de estimular la migración de linfocitos T en reposo. Por tanto, al inhibir estos estímulos por parte de los compuestos de *Spongionella*,

también se podría evitar la migración y la infiltración de leucocitos en condiciones no inflamatorias.

Las funciones de las Cyps extracelulares, están mediadas por la interacción de las Cyps al receptor de membrana CD147. La expresión de dicho receptor está aumentada en condiciones inflamatorias y está regulada por la CypA intracelular^{169, 318}. En este sentido, hay un sitio de unión para la CypA en el dominio transmembrana en el residuo Pro211 de CD147, que es el responsable del transporte del receptor a la superficie³⁸⁶. Como los compuestos derivados de *Spongionella* son capaces de modular los niveles de CypA intracelulares, se comprobó si también son capaces de modular la expresión del receptor. Se observa que tanto la GraL como los compuestos **1** y **2** son capaces de reducir la expresión de CD147 en la superficie de los linfocitos T del mismo modo que la CsA. Por lo tanto, esta reducción en la expresión del receptor podría estar mediada por una interacción directa con la CypA intracelular. Cabe destacar que, al reducir la expresión del receptor, también se reduce la interacción de las Cyps extracelulares con éste, reduciéndose la respuesta inflamatoria. Por otro lado, el receptor extracelular de CypC se desconoce, sin embargo, se ha hipotetizado un sitio de unión para la CypC en el receptor CD147³⁸⁵. Así, la inhibición de la expresión en la superficie celular de este receptor podría ser la causa indirecta de la reducción de CypB y CypC inducida por los compuestos de *Spongionella*. Aunque no se puede descartar un efecto directo sobre estas inmunofilinas, así como la inhibición de su actividad PPIasa. En cualquier caso, debido a la reducción de la expresión del receptor, de las Cyps o de ambos, estos compuestos también reducen la migración de los linfocitos T y, por lo tanto, podrían reducir la infiltración de estas células en los lugares de inflamación. Por otro lado, hay estudios que demuestran que los neutrófilos, monocitos y linfocitos T activados pierden la capacidad para migrar en presencia de CypA cuando se tratan con un anticuerpo monoclonal anti-CD147. Además, se han obtenido resultados prometedores en el tratamiento de procesos inflamatorios bloqueando la actividad del receptor CD147³⁸⁷. Por lo tanto, debe tenerse en cuenta que, si los compuestos pueden prevenir la migración de linfocitos T, también podrían prevenir la migración de neutrófilos y monocitos, células críticas en la respuesta inflamatoria.

Es importante resaltar que estos compuestos también reducen los niveles de CypC. Esta proteína está muy aumentada en la EAC, una condición relacionada con la inflamación, por lo que su modulación directa o indirecta podría ser una estrategia terapéutica útil en patologías con base inflamatoria^{388, 389}. Además, la disminución en la expresión y liberación de CypC es más evidente en presencia del compuesto **1** que en el compuesto **2** o GraL. Esta discrepancia puede apuntar a una permeabilidad celular diferente, otros objetivos celulares desconocidos o a variaciones en su estructura química. El compuesto **1** es un regioisómero del compuesto **2**, es decir, tiene un doble enlace en el anillo de ciclohexeno en una posición diferente que el compuesto **2** y la GraL^{317, 319}.

Tomando estos resultados en conjunto, podemos concluir que la GraL y los compuestos **1** y **2** muestran un potencial terapéutico interesante para el tratamiento de enfermedades inmunosupresoras e inflamatorias crónicas, ya que son capaces de inhibir los mediadores inflamatorios y mejorar los mecanismos antioxidantes, probablemente a través de la modulación CypA. Asimismo, estos compuestos actúa sobre las tres Cyps asociadas con enfermedades inflamatorias, restaurando sus niveles a valores control, lo que también podría evitar la activación de la vía inflamatoria en algunas patologías³⁹⁰. Además, pueden ser una

buena alternativa, tan efectivas como la CsA, mostrando menor citotoxicidad y efectos secundarios. Estos resultados están recogidos en la publicación “Cyclophilins A, B, and C role in human T lymphocytes upon inflammatory conditions”.

Continuando con los estudios del papel de las ciclofilinas en la inflamación, se analizaron los niveles de Cyps en pacientes con EAC. La EAC es una enfermedad con una base inflamatoria en la cual la principal causa subyacente es la aterosclerosis coronaria. A pesar de que la patogenia de la aterosclerosis está asociada con la inflamación, las terapias actuales tienen como principal objetivo la prevención de la trombosis y el tratamiento de la hiperlipidemia³⁹¹. En este sentido, podría ser interesante modificar el enfoque terapéutico, centrándose en el desarrollo de nuevas terapias antiinflamatorias y mejorar la comprensión del mecanismo molecular involucrado en esta patología. Además, como se mencionó anteriormente, los linfocitos T juegan un papel importante en el desarrollo y patogénesis de la EAC y ante estímulos inflamatorios, estas células liberan CypA¹⁷⁷. Sin embargo, no hay datos sobre los niveles de Cyps intracelulares en células T de pacientes con CAD. Por este motivo, se estudió el perfil de las Cyps en linfocitos T de pacientes con EAC, así como la expresión del receptor CD147 para conocer mejor el vínculo entre el sistema inflamatorio y la EAC. Se observó que los niveles de CypA y CypB están elevados en pacientes con EAC en comparación con los sujetos control. Por un lado, estas inmunofilinas se liberaron al medio, especialmente en pacientes con EAC aguda. Por otro lado, los niveles de CypA y CypB también están aumentados en el citosol de los linfocitos T aislados de estos pacientes. Ambas proteínas podrían estar participando en la formación de placa de ateroma y estar implicados en la sintomatología de los pacientes con EAC aguda. Como ocurre en los sujetos del presente estudio, también se han encontrado niveles elevados de CypA y CypB en pacientes con enfermedades relacionadas con la inflamación, así como artritis reumatoide, sepsis o diabetes tipo 2^{168, 385}. Además, los niveles extracelulares de CypA y B están correlacionados, respectivamente, con los niveles citosólicos de CypA y B en las células T. En este sentido, se podría plantear la hipótesis de que parte de los niveles séricos de CypA y B provienen de linfocitos T, lo que refuerza el papel de las células T y estas Cyps en la EAC^{200, 392}. Igualmente, tanto en pacientes crónicos como agudos, los niveles séricos de CypC estaban elevados, existiendo una correlación positiva entre los niveles de CypA y B intracelulares con CypC extracelular. En cuanto a CypC intracelular, no pudo ser detectada mediante western blot, ya que por resultados obtenidos anteriormente se observó que la CypC se puede detectar en fracciones ricas del aparato de Golgi y el RE. Para obtener esta fracción es necesario un número elevado de linfocitos T y por lo tanto de sangre. Por la imposibilidad de extraer altas cantidades de sangre a pacientes con EAC, no se pudieron medir los niveles intracelulares de CypC. Estos datos sugieren que las CypA, B y C participan en la EAC, sin embargo, su mecanismo exacto subyacente en esta patología sigue sin estar claro. Estos datos muestran por primera vez los niveles de Cyps y su correlación en linfocitos T aislados de pacientes con EAC crónica y aguda. En cuanto a los datos de las Cyps en suero de pacientes con EAC, están en la línea de los datos obtenidos en un estudio a mayor escala, donde además, se propone a la CypC como biomarcador de EAC³⁸⁸. También se midieron dos ILs relacionadas con la inflamación, la IL-1 β e IL-6. Se observó que estas ILs están aumentadas en pacientes con EAC aguda.

Se sabe que la CypD está relacionada con la patogénesis de algunas enfermedades cardiovasculares como la insuficiencia cardíaca y la aterosclerosis. Esta proteína participa en la

apertura de mPTP y en varios procesos patológicos, como diabetes, distrofia muscular y envejecimiento^{124, 224, 393}. A pesar de su papel en la patogenia de las enfermedades cardiovasculares, los niveles de CypD no se ven modificados en los linfocitos T de pacientes con EAC. Probablemente esto esté relacionado con la localización de la CypD en el poro mitocondrial²²⁰. Sin embargo, aunque esta Cyp está claramente implicada en el daño inducido por isquemia reperusión, no es un objetivo claro de cardioprotección, ya que se han obtenido resultados contradictorios tras su inhibición^{394, 395}. Por lo tanto, serían necesarios más estudios para comprender mejor el papel de esta inmunofilina y entender la relevancia de estos hallazgos.

En pacientes con enfermedades inflamatorias, el receptor CD147 está sobreexpresado en la superficie de los linfocitos T, sin embargo, se desconoce sus niveles en los linfocitos T de pacientes con EAC³⁹⁶. En este sentido, se observa que en los linfocitos T aislados de pacientes con EAC el receptor está sobreexpresado cuando se compara con los niveles de los controles. Además, estos niveles se correlacionan con los niveles séricos de CypA, B y C y con los niveles intracelulares de CypA y B. Por lo tanto, teniendo en cuenta estos resultados obtenidos, sumados a los altos niveles de Cyps e ILs en el suero de los pacientes, la inflamación y la enfermedad de la EAC tienen una clara relación, especialmente con el proceso agudo, donde las CypA, B y C y su receptor parecen jugar un papel importante. Asimismo, los niveles de Cyps y su receptor en células T pueden tener un valor pronóstico para la enfermedad. Estos resultados están recogidos en la publicación “Crosstalk between cyclophilins and T lymphocytes in coronary artery disease”.

Por otro lado, sabiendo que las Cyps extracelulares necesitan unirse al receptor CD147 para ejercer su actividad quimioatrayente, este receptor sería una buena diana para evitar la formación y desarrollo de placa de ateroma. Además, la modulación de Cyps intra y extracelulares podría ayudar a prevenir la cascada inflamatoria que se activa en numerosas enfermedades crónicas. Con lo cual, poniendo en conjunto estos resultados sumados a los obtenidos con la GraL y los compuestos **1** y **2** en los ensayos de modulación de la inflamación, las Cyps y el receptor CD147, se podría hipotetizar que estos compuestos son una herramienta útil en la modulación de enfermedades con base inflamatoria como la EAC.



6. CONCLUSIONES

1. Las zoanthaminas, aisladas del coral *Zoanthus* cf. *pulchellus* reducen la producción y liberación de los mediadores inflamatorios NO y ROS.
2. Las characellides, aisladas de la esponja *Characella pachastrelloides*, reducen la producción de ROS y mantienen el potencial de membrana mitocondrial en condiciones de inflamación, siendo mayor la actividad de la characellide B.
3. Las futunas, extraídas de la esponja *Narrabeena nigra* y las futunaminas, purificadas de la esponja *Stylissa* aff. *carteri*, tienen propiedades neuroprotectoras al reducir el daño oxidativo e inhibir la liberación de mediadores inflamatorios.
4. La anhidroexfoliamicina, obtenida de bacterias del género *Streptomyces*, modula el estado fenotípico de la microglía activada e inhibe su respuesta inflamatoria y por lo tanto tiene efecto neuroprotector.
5. La gracilina L aislada de la esponja *Spongionella gacilis* y dos análogos sintéticos, el compuesto **1** y el compuesto **2**, muestran efectos antiinflamatorios sobre células de la microglía a través de la modulación de la CypA.
6. Los linfocitos T, en condiciones de inflamación, aumentan la expresión y la liberación de CypA, CypB y CypC y la expresión del receptor de membrana CD147.
7. La gracilina L y los compuestos **1** y **2** reducen los niveles de CypA, CypB y CypC y la expresión del receptor de membrana CD147 en linfocitos T, así como la migración de estas células en presencia de CypA y CypB.
8. La expresión intracelular de CypA y CypB y la expresión del receptor de membrana CD147 están aumentadas en los linfocitos T aislados de pacientes con la enfermedad de las arterias coronarias.
9. En el suero de estos pacientes con enfermedad aguda de las arterias coronarias, los niveles de CypA y CypC son seis veces superiores a los niveles control. Mientras que en pacientes con enfermedad crónica solo se mantiene alta la CypC. Estos incrementos se correlacionan con un aumento de las citocinas proinflamatorias IL-1 β e IL-6.



7. REFERENCIAS

1. Medzhitov, R. (2010) Inflammation 2010: new adventures of an old flame, *Cell* 140, 771-776.
2. Tasneem, S., Liu, B., Li, B., Choudhary, M. I., and Wang, W. (2019) Molecular pharmacology of inflammation: Medicinal plants as anti-inflammatory agents, *Pharmacol Res* 139, 126-140.
3. Choy, E. H., and Panayi, G. S. (2001) Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis, *N Engl J Med* 344, 907-916.
4. Coussens, L. M., and Werb, Z. (2002) Inflammation and cancer, *Nature* 420, 860-867.
5. Kalinchenko, S. Y., Tishova, Y. A., Mskhalaya, G. J., Gooren, L. J., Giltay, E. J., and Saad, F. (2010) Effects of testosterone supplementation on markers of the metabolic syndrome and inflammation in hypogonadal men with the metabolic syndrome: the double-blinded placebo-controlled Moscow study, *Clin Endocrinol (Oxf)* 73, 602-612.
6. Shirazi, L. F., Bissett, J., Romeo, F., and Mehta, J. L. (2017) Role of Inflammation in Heart Failure, *Curr Atheroscler Rep* 19, 27.
7. Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., and Gage, F. H. (2010) Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration, *Cell* 140, 918-934.
8. Singh, N., Baby, D., Rajguru, J. P., Patil, P. B., Thakkannavar, S. S., and Pujari, V. B. (2019) Inflammation and cancer, *Ann Afr Med* 18, 121-126.
9. Pecchi, E., Dallaporta, M., Jean, A., Thirion, S., and Troadec, J. D. (2009) Prostaglandins and sickness behavior: old story, new insights, *Physiol Behav* 97, 279-292.
10. Serhan, C. N., and Savill, J. (2005) Resolution of inflammation: the beginning programs the end, *Nat Immunol* 6, 1191-1197.
11. Majno, G., and Joris, I. (2004) *Cells, tissues, and disease : principles of general pathology*, 2nd ed ed., Oxford University Press, New York.
12. Robbins, S. L., Kumar, V., and Cotran, R. S. (2003) *Robbins basic pathology*, 7th ed., Saunders, Philadelphia.
13. Zhong, J., and Shi, G. (2019) Editorial: Regulation of Inflammation in Chronic Disease, *Front Immunol* 10, 737.
14. Hotamisligil, G. S. (2006) Inflammation and metabolic disorders, *Nature* 444, 860-867.
15. Murphy, K., and Weaver, C. (2017) *Janeway's immunobiology 9th edition*, 9th edition. ed.
16. Chovatiya, R., and Medzhitov, R. (2014) Stress, inflammation, and defense of homeostasis, *Mol Cell* 54, 281-288.
17. Sprangers, S., de Vries, T. J., and Everts, V. (2016) Monocyte Heterogeneity: Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells, *J Immunol Res* 2016, 1475435.
18. Racanelli, A. C., Kikkers, S. A., Choi, A. M. K., and Cloonan, S. M. (2018) Autophagy and inflammation in chronic respiratory disease, *Autophagy* 14, 221-232.
19. Golebiewska, E. M., and Poole, A. W. (2015) Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond, *Blood Rev* 29, 153-162.
20. Li, C., Xu, M. M., Wang, K., Adler, A. J., Vella, A. T., and Zhou, B. (2018) Macrophage polarization and meta-inflammation, *Transl Res* 191, 29-44.

21. Park, S. E., Sapkota, K., Kim, S., Kim, H., and Kim, S. J. (2011) Kaempferol acts through mitogen-activated protein kinases and protein kinase B/AKT to elicit protection in a model of neuroinflammation in BV2 microglial cells, *Br J Pharmacol* 164, 1008-1025.
22. Ponomarev, E. D., Maresz, K., Tan, Y., and Dittel, B. N. (2007) CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells, *J Neurosci* 27, 10714-10721.
23. Wang, Y., Huang, Y., Xu, Y., Ruan, W., Wang, H., Zhang, Y., Saavedra, J. M., Zhang, L., Huang, Z., and Pang, T. (2018) A Dual AMPK/Nrf2 Activator Reduces Brain Inflammation After Stroke by Enhancing Microglia M2 Polarization, *Antioxid Redox Signal* 28, 141-163.
24. Colton, C., and Wilcock, D. M. (2010) Assessing activation states in microglia, *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9, 174-191.
25. Tang, Y., and Le, W. (2016) Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases, *Mol Neurobiol* 53, 1181-1194.
26. Nakamura, Y. (2000) [Regulating factors for microglial activation], *Seikagaku* 72, 465-468.
27. Block, M. L., Zecca, L., and Hong, J. S. (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms, *Nat Rev Neurosci* 8, 57-69.
28. Zusso, M., Lunardi, V., Franceschini, D., Pagetta, A., Lo, R., Stifani, S., Frigo, A. C., Giusti, P., and Moro, S. (2019) Ciprofloxacin and levofloxacin attenuate microglia inflammatory response via TLR4/NF-kB pathway, *J Neuroinflammation* 16, 148.
29. Valipour, B., Velaei, K., Abedelahi, A., Karimipour, M., Darabi, M., and Charoudeh, H. N. (2019) NK cells: An attractive candidate for cancer therapy, *J Cell Physiol* 234, 19352-19365.
30. Griss, J., Bauer, W., Wagner, C., Simon, M., Chen, M., Grabmeier-Pfistershammer, K., Maurer-Granofszky, M., Roka, F., Penz, T., Bock, C., Zhang, G., Herlyn, M., Glatz, K., Laubli, H., Mertz, K. D., Petzelbauer, P., Wiesner, T., Hartl, M., Pickl, W. F., Somasundaram, R., Steinberger, P., and Wagner, S. N. (2019) B cells sustain inflammation and predict response to immune checkpoint blockade in human melanoma, *Nat Commun* 10, 4186.
31. Birnbaum, M. E., Mendoza, J. L., Sethi, D. K., Dong, S., Glanville, J., Dobbins, J., Ozkan, E., Davis, M. M., Wucherpfennig, K. W., and Garcia, K. C. (2014) Deconstructing the peptide-MHC specificity of T cell recognition, *Cell* 157, 1073-1087.
32. Samelson, L. E., and Klausner, R. D. (1988) The T-cell antigen receptor. Structure and mechanism of activation, *Ann N Y Acad Sci* 540, 1-3.
33. Chakraborty, A. K., and Weiss, A. (2014) Insights into the initiation of TCR signaling, *Nat Immunol* 15, 798-807.
34. Kovanen, P. E., and Leonard, W. J. (2004) Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma(c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways, *Immunol Rev* 202, 67-83.
35. Kaplansky, G., and Bongrand, P. (2001) Cytokines and chemokines, *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 47, 569-574.
36. Balkwill, F., and Mantovani, A. (2010) Cancer and inflammation: implications for pharmacology and therapeutics, *Clin Pharmacol Ther* 87, 401-406.
37. Balkwill, F. (2006) TNF-alpha in promotion and progression of cancer, *Cancer Metastasis Rev* 25, 409-416.
38. Brenner, D., Blaser, H., and Mak, T. W. (2015) Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die, *Nat Rev Immunol* 15, 362-374.
39. Bradley, J. R. (2008) TNF-mediated inflammatory disease, *J Pathol* 214, 149-160.

40. Faustman, D., and Davis, M. (2010) TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases, *Nat Rev Drug Discov* 9, 482-493.
41. Croft, M., Duan, W., Choi, H., Eun, S. Y., Madireddi, S., and Mehta, A. (2012) TNF superfamily in inflammatory disease: translating basic insights, *Trends Immunol* 33, 144-152.
42. Apte, R. N., Krelm, Y., Song, X., Dotan, S., Recih, E., Elkabets, M., Carmi, Y., Dvorkin, T., White, R. M., Gayvoronsky, L., Segal, S., and Voronov, E. (2006) Effects of micro-environment- and malignant cell-derived interleukin-1 in carcinogenesis, tumour invasiveness and tumour-host interactions, *Eur J Cancer* 42, 751-759.
43. Dinarello, C. A. (2011) Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases, *Blood* 117, 3720-3732.
44. Abbate, A., Van Tassell, B. W., and Biondi-Zoccai, G. G. (2012) Blocking interleukin-1 as a novel therapeutic strategy for secondary prevention of cardiovascular events, *BioDrugs* 26, 217-233.
45. Guo, L. L., Wu, M. T., Zhang, L. W., Chu, Y. X., Tian, P., Jing, Z. P., Li, J. S., Sun, Y. D., Yeung, K. K., and Zhang, L. (2020) Blocking Interleukin-1 Beta Reduces the Evolution of Thoracic Aortic Dissection in a Rodent Model, *Eur J Vasc Endovasc Surg* 60, 916-924.
46. Chalaris, A., Garbers, C., Rabe, B., Rose-John, S., and Scheller, J. (2011) The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer, *Eur J Cell Biol* 90, 484-494.
47. Hunter, C. A., and Jones, S. A. (2015) IL-6 as a keystone cytokine in health and disease, *Nat Immunol* 16, 448-457.
48. Uciechowski, P., and Dempke, W. C. M. (2020) Interleukin-6: A Masterplayer in the Cytokine Network, *Oncology* 98, 131-137.
49. Uchida, T., Fujimori, F., Tradler, T., Fischer, G., and Rahfeld, J. U. (1999) Identification and characterization of a 14 kDa human protein as a novel parvulin-like peptidyl prolyl cis/trans isomerase, *FEBS Lett* 446, 278-282.
50. Masjedi, A., Hashemi, V., Hojjat-Farsangi, M., Ghalamfarsa, G., Azizi, G., Yousefi, M., and Jadidi-Niaragh, F. (2018) The significant role of interleukin-6 and its signaling pathway in the immunopathogenesis and treatment of breast cancer, *Biomed Pharmacother* 108, 1415-1424.
51. Lu, R., Zhang, J., Sun, W., Du, G., and Zhou, G. (2015) Inflammation-related cytokines in oral lichen planus: an overview, *J Oral Pathol Med* 44, 1-14.
52. Mannino, M. H., Zhu, Z., Xiao, H., Bai, Q., Wakefield, M. R., and Fang, Y. (2015) The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer, *Cancer Lett* 367, 103-107.
53. Michels, M., Danielski, L. G., Dal-Pizzol, F., and Petronilho, F. (2014) Neuroinflammation: microglial activation during sepsis, *Curr Neurovasc Res* 11, 262-270.
54. Nagarsheth, N., Wicha, M. S., and Zou, W. (2017) Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy, *Nat Rev Immunol* 17, 559-572.
55. Castan, L., Magnan, A., and Bouchaud, G. (2017) Chemokine receptors in allergic diseases, *Allergy* 72, 682-690.
56. Le Thuc, O., Blondeau, N., Nahon, J. L., and Rovere, C. (2015) The complex contribution of chemokines to neuroinflammation: switching from beneficial to detrimental effects, *Ann N Y Acad Sci* 1351, 127-140.
57. Asquith, D. L., Bryce, S. A., and Nibbs, R. J. (2015) Targeting cell migration in rheumatoid arthritis, *Curr Opin Rheumatol* 27, 204-211.
58. Thiel, G., Ulrich, M., Mukaida, N., and Rossler, O. G. (2018) Resveratrol stimulation induces interleukin-8 gene transcription via NF-kappaB, *Pharmacol Res* 134, 238-245.

59. O'Connor, T., Borsig, L., and Heikenwalder, M. (2015) CCL2-CCR2 Signaling in Disease Pathogenesis, *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 15, 105-118.
60. Rosalki, S. B., Foo, A. Y., and Arntsen, K. W. (1989) Alkaline phosphatase of possible renal origin identified in plasma after colchicine overdose, *Clin Chem* 35, 702.
61. Chen, W. S., Villaflores, O. B., Jinn, T. R., Chan, M. T., Chang, Y. C., and Wu, T. Y. (2011) Expression of recombinant human interferon-gamma with antiviral activity in the bi-cistronic baculovirus-insect/larval system, *Biosci Biotechnol Biochem* 75, 1342-1348.
62. Kim, E. Y., and Moudgil, K. D. (2017) Immunomodulation of autoimmune arthritis by pro-inflammatory cytokines, *Cytokine* 98, 87-96.
63. Voloshyna, I., Littlefield, M. J., and Reiss, A. B. (2014) Atherosclerosis and interferon-gamma: new insights and therapeutic targets, *Trends Cardiovasc Med* 24, 45-51.
64. Lari, R., Fleetwood, A. J., Kitchener, P. D., Cook, A. D., Pavasovic, D., Hertzog, P. J., and Hamilton, J. A. (2007) Macrophage lineage phenotypes and osteoclastogenesis--complexity in the control by GM-CSF and TGF-beta, *Bone* 40, 323-336.
65. Akhurst, R. J., and Padgett, R. W. (2015) Matters of context guide future research in TGFbeta superfamily signaling, *Sci Signal* 8, re10.
66. Begni, V., Riva, M. A., and Cattaneo, A. (2017) Cellular and molecular mechanisms of the brain-derived neurotrophic factor in physiological and pathological conditions, *Clin Sci (Lond)* 131, 123-138.
67. Engin, A. (2017) Endothelial Dysfunction in Obesity, *Adv Exp Med Biol* 960, 345-379.
68. Badimon, L., Storey, R. F., and Vilahur, G. (2011) Update on lipids, inflammation and atherothrombosis, *Thromb Haemost* 105 Suppl 1, S34-42.
69. Kong, D. H., Kim, Y. K., Kim, M. R., Jang, J. H., and Lee, S. (2018) Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer, *Int J Mol Sci* 19.
70. Bui, T. M., Wiesolek, H. L., and Sumagin, R. (2020) ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis, *J Leukoc Biol* 108, 787-799.
71. Lyck, R., and Enzmann, G. (2015) The physiological roles of ICAM-1 and ICAM-2 in neutrophil migration into tissues, *Curr Opin Hematol* 22, 53-59.
72. Kucukguven, A., and Khalil, R. A. (2013) Matrix metalloproteinases as potential targets in the venous dilation associated with varicose veins, *Curr Drug Targets* 14, 287-324.
73. Mittal, R., Patel, A. P., Debs, L. H., Nguyen, D., Patel, K., Grati, M., Mittal, J., Yan, D., Chapagain, P., and Liu, X. Z. (2016) Intricate Functions of Matrix Metalloproteinases in Physiological and Pathological Conditions, *J Cell Physiol* 231, 2599-2621.
74. MacColl, E., and Khalil, R. A. (2015) Matrix Metalloproteinases as Regulators of Vein Structure and Function: Implications in Chronic Venous Disease, *J Pharmacol Exp Ther* 355, 410-428.
75. Oeckinghaus, A., and Ghosh, S. (2009) The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a000034.
76. Zhang, H., and Sun, S. C. (2015) NF-kappaB in inflammation and renal diseases, *Cell Biosci* 5, 63.
77. Smale, S. T. (2012) Dimer-specific regulatory mechanisms within the NF-kappaB family of transcription factors, *Immunol Rev* 246, 193-204.
78. Vallabhapurapu, S., and Karin, M. (2009) Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system, *Annu Rev Immunol* 27, 693-733.
79. Sun, S. C., and Ley, S. C. (2008) New insights into NF-kappaB regulation and function, *Trends Immunol* 29, 469-478.

80. Hayden, M. S., and Ghosh, S. (2008) Shared principles in NF-kappaB signaling, *Cell* 132, 344-362.
81. Sun, S. C. (2012) The noncanonical NF-kappaB pathway, *Immunol Rev* 246, 125-140.
82. Sun, S. C., and Liu, Z. G. (2011) A special issue on NF-kappaB signaling and function, *Cell Res* 21, 1-2.
83. Saccani, A., Schioppa, T., Porta, C., Biswas, S. K., Nebuloni, M., Vago, L., Bottazzi, B., Colombo, M. P., Mantovani, A., and Sica, A. (2006) p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance, *Cancer Res* 66, 11432-11440.
84. Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J., and Rao, A. (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT, *Genes Dev* 17, 2205-2232.
85. Viola, J. P., Carvalho, L. D., Fonseca, B. P., and Teixeira, L. K. (2005) NFAT transcription factors: from cell cycle to tumor development, *Braz J Med Biol Res* 38, 335-344.
86. Okamura, H., Aramburu, J., Garcia-Rodriguez, C., Viola, J. P., Raghavan, A., Tahiliani, M., Zhang, X., Qin, J., Hogan, P. G., and Rao, A. (2000) Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity, *Mol Cell* 6, 539-550.
87. Kaminuma, O., Deckert, M., Elly, C., Liu, Y. C., and Altman, A. (2001) Vav-Rac1-mediated activation of the c-Jun N-terminal kinase/c-Jun/AP-1 pathway plays a major role in stimulation of the distal NFAT site in the interleukin-2 gene promoter, *Mol Cell Biol* 21, 3126-3136.
88. Giffin, M. J., Stroud, J. C., Bates, D. L., von Koenig, K. D., Hardin, J., and Chen, L. (2003) Structure of NFAT1 bound as a dimer to the HIV-1 LTR kappa B element, *Nat Struct Biol* 10, 800-806.
89. Rubinfeld, H., and Seger, R. (2005) The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling, *Mol Biotechnol* 31, 151-174.
90. Strniskova, M., Barancik, M., and Ravingerova, T. (2002) Mitogen-activated protein kinases and their role in regulation of cellular processes, *Gen Physiol Biophys* 21, 231-255.
91. Arisawa, T., Tahara, T., Shibata, T., Nagasaka, M., Nakamura, M., Kamiya, Y., Fujita, H., Hasegawa, S., Takagi, T., Wang, F. Y., Hirata, I., and Nakano, H. (2007) The relationship between *Helicobacter pylori* infection and promoter polymorphism of the Nrf2 gene in chronic gastritis, *Int J Mol Med* 19, 143-148.
92. Kobayashi, E. H., Suzuki, T., Funayama, R., Nagashima, T., Hayashi, M., Sekine, H., Tanaka, N., Moriguchi, T., Motohashi, H., Nakayama, K., and Yamamoto, M. (2016) Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription, *Nat Commun* 7, 11624.
93. Draheim, T., Liessem, A., Scheld, M., Wilms, F., Weissflog, M., Denecke, B., Kensler, T. W., Zendedel, A., Beyer, C., Kipp, M., Wruck, C. J., Fragoulis, A., and Clarner, T. (2016) Activation of the astrocytic Nrf2/ARE system ameliorates the formation of demyelinating lesions in a multiple sclerosis animal model, *Glia* 64, 2219-2230.
94. Silva-Islas, C. A., and Maldonado, P. D. (2018) Canonical and non-canonical mechanisms of Nrf2 activation, *Pharmacol Res* 134, 92-99.
95. Bellezza, I., Giambanco, I., Minelli, A., and Donato, R. (2018) Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1865, 721-733.
96. Brigelius-Flohe, R., and Flohe, L. (2011) Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors, *Antioxid Redox Signal* 15, 2335-2381.

97. Yang, H., Magilnick, N., Ou, X., and Lu, S. C. (2005) Tumour necrosis factor alpha induces co-ordinated activation of rat GSH synthetic enzymes via nuclear factor kappaB and activator protein-1, *Biochem J* 391, 399-408.
98. Ahmed, S. M., Luo, L., Namani, A., Wang, X. J., and Tang, X. (2017) Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation, *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863, 585-597.
99. Huppa, J. B., and Davis, M. M. (2003) T-cell-antigen recognition and the immunological synapse, *Nat Rev Immunol* 3, 973-983.
100. Love, P. E., and Hayes, S. M. (2010) ITAM-mediated signaling by the T-cell antigen receptor, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a002485.
101. Love, P. E., Lee, J., and Shores, E. W. (2000) Critical relationship between TCR signaling potential and TCR affinity during thymocyte selection, *J Immunol* 165, 3080-3087.
102. Fitzgerald, K. A., and Kagan, J. C. (2020) Toll-like Receptors and the Control of Immunity, *Cell* 180, 1044-1066.
103. Luo, L., Lucas, R. M., Liu, L., and Stow, J. L. (2019) Signalling, sorting and scaffolding adaptors for Toll-like receptors, *J Cell Sci* 133.
104. Kang, J. Y., Nan, X., Jin, M. S., Youn, S. J., Ryu, Y. H., Mah, S., Han, S. H., Lee, H., Paik, S. G., and Lee, J. O. (2009) Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer, *Immunity* 31, 873-884.
105. Triantafilou, M., Gamper, F. G., Haston, R. M., Mouratis, M. A., Morath, S., Hartung, T., and Triantafilou, K. (2006) Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting, *J Biol Chem* 281, 31002-31011.
106. Eftychi, C., Schwarzer, R., Vlantis, K., Wachsmuth, L., Basic, M., Wagle, P., Neurath, M. F., Becker, C., Bleich, A., and Pasparakis, M. (2019) Temporally Distinct Functions of the Cytokines IL-12 and IL-23 Drive Chronic Colon Inflammation in Response to Intestinal Barrier Impairment, *Immunity* 51, 367-380 e364.
107. Zwicky, P., Unger, S., and Becher, B. (2020) Targeting interleukin-17 in chronic inflammatory disease: A clinical perspective, *J Exp Med* 217.
108. Schafer, F. Q., and Buettner, G. R. (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple, *Free Radic Biol Med* 30, 1191-1212.
109. Yanar, K., Simsek, B., and Cakatay, U. (2019) Integration of Melatonin Related Redox Homeostasis, Aging, and Circadian Rhythm, *Rejuvenation Res* 22, 409-419.
110. Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J., and Valko, M. (2017) Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases, *Trends Pharmacol Sci* 38, 592-607.
111. Alfadda, A. A., and Sallam, R. M. (2012) Reactive oxygen species in health and disease, *J Biomed Biotechnol* 2012, 936486.
112. Pacher, P., Beckman, J. S., and Liaudet, L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease, *Physiol Rev* 87, 315-424.
113. Radi, R. (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4003-4008.
114. Lugin, J., Rosenblatt-Velin, N., Parapanov, R., and Liaudet, L. (2014) The role of oxidative stress during inflammatory processes, *Biol Chem* 395, 203-230.
115. Kirkland, J. L., and Tchkonja, T. (2017) Cellular Senescence: A Translational Perspective, *EBioMedicine* 21, 21-28.
116. Geovanini, G. R., and Libby, P. (2018) Atherosclerosis and inflammation: overview and updates, *Clin Sci (Lond)* 132, 1243-1252.

117. Yeung, Y. T., Aziz, F., Guerrero-Castilla, A., and Arguelles, S. (2018) Signaling Pathways in Inflammation and Anti-inflammatory Therapies, *Curr Pharm Des* 24, 1449-1484.
118. Li, B., Li, W., Li, X., and Zhou, H. (2017) Inflammation: A Novel Therapeutic Target/Direction in Atherosclerosis, *Curr Pharm Des* 23, 1216-1227.
119. Brophy, M. L., Dong, Y., Wu, H., Rahman, H. N., Song, K., and Chen, H. (2017) Eating the Dead to Keep Atherosclerosis at Bay, *Front Cardiovasc Med* 4, 2.
120. Aquila, G., Marracino, L., Martino, V., Calabria, D., Campo, G., Caliceti, C., and Rizzo, P. (2019) The Use of Nutraceuticals to Counteract Atherosclerosis: The Role of the Notch Pathway, *Oxid Med Cell Longev* 2019, 5470470.
121. Libby, P., Ridker, P. M., Hansson, G. K., and Leducq Transatlantic Network on, A. (2009) Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice, *J Am Coll Cardiol* 54, 2129-2138.
122. Yurchenko, V., Zybarth, G., O'Connor, M., Dai, W. W., Franchin, G., Hao, T., Guo, H., Hung, H. C., Toole, B., Gallay, P., Sherry, B., and Bukrinsky, M. (2002) Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147, *J Biol Chem* 277, 22959-22965.
123. Nigro, P., Pompilio, G., and Capogrossi, M. C. (2013) Cyclophilin A: a key player for human disease, *Cell Death Dis* 4, e888.
124. Singh, K., Winter, M., Zouhar, M., and Rysanek, P. (2018) Cyclophilins: Less Studied Proteins with Critical Roles in Pathogenesis, *Phytopathology* 108, 6-14.
125. Perrucci, G. L., Gowran, A., Zanolini, M., Capogrossi, M. C., Pompilio, G., and Nigro, P. (2015) Peptidyl-prolyl isomerases: a full cast of critical actors in cardiovascular diseases, *Cardiovasc Res* 106, 353-364.
126. Lu, K. P., Finn, G., Lee, T. H., and Nicholson, L. K. (2007) Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer, *Nat Chem Biol* 3, 619-629.
127. Aumuller, T., Jahreis, G., Fischer, G., and Schiene-Fischer, C. (2010) Role of prolyl cis/trans isomers in cyclophilin-assisted *Pseudomonas syringae* AvrRpt2 protease activation, *Biochemistry* 49, 1042-1052.
128. Sarkar, P., Reichman, C., Saleh, T., Birge, R. B., and Kalodimos, C. G. (2007) Proline cis-trans isomerization controls autoinhibition of a signaling protein, *Mol Cell* 25, 413-426.
129. Pemberton, T. J., and Kay, J. E. (2005) Identification and comparative analysis of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase repertoires of *H. sapiens*, *D. melanogaster*, *C. elegans*, *S. cerevisiae* and *Sz. pombe*, *Comp Funct Genomics* 6, 277-300.
130. Hanes, S. D. (2015) Prolyl isomerases in gene transcription, *Biochim Biophys Acta* 1850, 2017-2034.
131. Gothel, S. F., and Marahiel, M. A. (1999) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts, *Cell Mol Life Sci* 55, 423-436.
132. Takahashi, N., Hayano, T., and Suzuki, M. (1989) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin, *Nature* 337, 473-475.
133. Harding, M. W., Galat, A., Uehling, D. E., and Schreiber, S. L. (1989) A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase, *Nature* 341, 758-760.
134. Zoldak, G., Aumuller, T., Lucke, C., Hritz, J., Oostenbrink, C., Fischer, G., and Schmid, F. X. (2009) A library of fluorescent peptides for exploring the substrate specificities of prolyl isomerases, *Biochemistry* 48, 10423-10436.
135. Kessler, D., Papatheodorou, P., Stratmann, T., Dian, E. A., Hartmann-Fatu, C., Rassow, J., Bayer, P., and Mueller, J. W. (2007) The DNA binding parvulin Par17 is targeted to the mitochondrial matrix by a recently evolved prepeptide uniquely present in Hominidae, *BMC Biol* 5, 37.

136. Lu, K. P., Hanes, S. D., and Hunter, T. (1996) A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis, *Nature* 380, 544-547.
137. Hennig, L., Christner, C., Kipping, M., Schelbert, B., Rucknagel, K. P., Grabley, S., Kullertz, G., and Fischer, G. (1998) Selective inactivation of parvulin-like peptidyl-prolyl cis/trans isomerases by juglone, *Biochemistry* 37, 5953-5960.
138. Driver, J. A., and Lu, K. P. (2010) Pin1: a new genetic link between Alzheimer's disease, cancer and aging, *Curr Aging Sci* 3, 158-165.
139. Lin, C. H., Li, H. Y., Lee, Y. C., Calkins, M. J., Lee, K. H., Yang, C. N., and Lu, P. J. (2015) Landscape of Pin1 in the cell cycle, *Exp Biol Med (Maywood)* 240, 403-408.
140. Matena, A., Rehic, E., Honig, D., Kamba, B., and Bayer, P. (2018) Structure and function of the human parvulins Pin1 and Par14/17, *Biol Chem* 399, 101-125.
141. Foor, F., Parent, S. A., Morin, N., Dahl, A. M., Ramadan, N., Chrebet, G., Bostian, K. A., and Nielsen, J. B. (1992) Calcineurin mediates inhibition by FK506 and cyclosporin of recovery from alpha-factor arrest in yeast, *Nature* 360, 682-684.
142. Cardenas, M. E., Zhu, D., and Heitman, J. (1995) Molecular mechanisms of immunosuppression by cyclosporine, FK506, and rapamycin, *Curr Opin Nephrol Hypertens* 4, 472-477.
143. Kang, C. B., Hong, Y., Dhe-Paganon, S., and Yoon, H. S. (2008) FKBP family proteins: immunophilins with versatile biological functions, *Neurosignals* 16, 318-325.
144. Kolos, J. M., Voll, A. M., Bauder, M., and Hausch, F. (2018) FKBP Ligands-Where We Are and Where to Go?, *Front Pharmacol* 9, 1425.
145. Thapar, R. (2015) Roles of Prolyl Isomerases in RNA-Mediated Gene Expression, *Biomolecules* 5, 974-999.
146. Kumari, S., Roy, S., Singh, P., Singla-Pareek, S. L., and Pareek, A. (2013) Cyclophilins: proteins in search of function, *Plant Signal Behav* 8, e22734.
147. Brown, C. R., Cui, D. Y., Hung, G. G., and Chiang, H. L. (2001) Cyclophilin A mediates Vid22p function in the import of fructose-1,6-bisphosphatase into Vid vesicles, *J Biol Chem* 276, 48017-48026.
148. Fujimori, F., Gunji, W., Kikuchi, J., Mogi, T., Ohashi, Y., Makino, T., Oyama, A., Okuhara, K., Uchida, T., and Murakami, Y. (2001) Crosstalk of prolyl isomerases, Pin1/Ess1, and cyclophilin A, *Biochem Biophys Res Commun* 289, 181-190.
149. Kumari, S., Joshi, R., Singh, K., Roy, S., Tripathi, A. K., Singh, P., Singla-Pareek, S. L., and Pareek, A. (2015) Expression of a cyclophilin OsCyp2-P isolated from a salt-tolerant landrace of rice in tobacco alleviates stress via ion homeostasis and limiting ROS accumulation, *Funct Integr Genomics* 15, 395-412.
150. Fischer, G., Bang, H., and Mech, C. (1984) [Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides], *Biomed Biochim Acta* 43, 1101-1111.
151. Volker, S. E., Hedrick, S. E., Feeney, Y. B., and Clevenger, C. V. (2018) Cyclophilin A Function in Mammary Epithelium Impacts Jak2/Stat5 Signaling, Morphogenesis, Differentiation, and Tumorigenesis in the Mammary Gland, *Cancer Res* 78, 3877-3887.
152. Xue, C., Sowden, M. P., and Berk, B. C. (2018) Extracellular and Intracellular Cyclophilin A, Native and Post-Translationally Modified, Show Diverse and Specific Pathological Roles in Diseases, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38, 986-993.
153. Bannon, J. H., O'Donovan, D. S., Kennelly, S. M., and Mc Gee, M. M. (2012) The peptidyl prolyl isomerase cyclophilin A localizes at the centrosome and the midbody and is required for cytokinesis, *Cell Cycle* 11, 1340-1353.

154. Suzuki, J., Jin, Z. G., Meoli, D. F., Matoba, T., and Berk, B. C. (2006) Cyclophilin A is secreted by a vesicular pathway in vascular smooth muscle cells, *Circ Res* 98, 811-817.
155. Boulos, S., Meloni, B. P., Arthur, P. G., Majda, B., Bojarski, C., and Knuckey, N. W. (2007) Evidence that intracellular cyclophilin A and cyclophilin A/CD147 receptor-mediated ERK1/2 signalling can protect neurons against in vitro oxidative and ischemic injury, *Neurobiol Dis* 25, 54-64.
156. Ge, Y. S., Teng, W. Y., and Zhang, C. D. (2009) Protective effect of cyclophilin A against Alzheimer's amyloid beta-peptide (25-35)-induced oxidative stress in PC12 cells, *Chin Med J (Engl)* 122, 716-724.
157. Yuan, W., Ge, H., and He, B. (2010) Pro-inflammatory activities induced by CyPA-EMMPRIN interaction in monocytes, *Atherosclerosis* 213, 415-421.
158. Nigro, P., Satoh, K., O'Dell, M. R., Soe, N. N., Cui, Z., Mohan, A., Abe, J., Alexis, J. D., Sparks, J. D., and Berk, B. C. (2011) Cyclophilin A is an inflammatory mediator that promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice, *J Exp Med* 208, 53-66.
159. Satoh, K., Nigro, P., Zeidan, A., Soe, N. N., Jaffre, F., Oikawa, M., O'Dell, M. R., Cui, Z., Menon, P., Lu, Y., Mohan, A., Yan, C., Blaxall, B. C., and Berk, B. C. (2011) Cyclophilin A promotes cardiac hypertrophy in apolipoprotein E-deficient mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 1116-1123.
160. Seizer, P., Ungern-Sternberg, S. N., Schonberger, T., Borst, O., Munzer, P., Schmidt, E. M., Mack, A. F., Heinzmann, D., Chatterjee, M., Langer, H., Malesevic, M., Lang, F., Gawaz, M., Fischer, G., and May, A. E. (2015) Extracellular cyclophilin A activates platelets via EMMPRIN (CD147) and PI3K/Akt signaling, which promotes platelet adhesion and thrombus formation in vitro and in vivo, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35, 655-663.
161. Jin, Z. G., Lungu, A. O., Xie, L., Wang, M., Wong, C., and Berk, B. C. (2004) Cyclophilin A is a proinflammatory cytokine that activates endothelial cells, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1186-1191.
162. Dear, J. W., Simpson, K. J., Nicolai, M. P., Catterson, J. H., Street, J., Huizinga, T., Craig, D. G., Dhaliwal, K., Webb, S., Bateman, D. N., and Webb, D. J. (2011) Cyclophilin A is a damage-associated molecular pattern molecule that mediates acetaminophen-induced liver injury, *J Immunol* 187, 3347-3352.
163. Nakamura, K., Kodama, J., Hongo, A., and Hiramatsu, Y. (2012) Role of emmprin in endometrial cancer, *BMC Cancer* 12, 191.
164. Schmidt, R., Bultmann, A., Fischel, S., Gillitzer, A., Cullen, P., Walch, A., Jost, P., Ungerer, M., Tolley, N. D., Lindemann, S., Gawaz, M., Schomig, A., and May, A. E. (2008) Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) is a novel receptor on platelets, activates platelets, and augments nuclear factor kappaB-dependent inflammation in monocytes, *Circ Res* 102, 302-309.
165. Seizer, P., Schonberger, T., Schott, M., Lang, M. R., Langer, H. F., Bigalke, B., Kramer, B. F., Borst, O., Daub, K., Heidenreich, O., Schmidt, R., Lindemann, S., Herouy, Y., Gawaz, M., and May, A. E. (2010) EMMPRIN and its ligand cyclophilin A regulate MT1-MMP, MMP-9 and M-CSF during foam cell formation, *Atherosclerosis* 209, 51-57.
166. Schlegel, J., Redzic, J. S., Porter, C. C., Yurchenko, V., Bukrinsky, M., Labeikovsky, W., Armstrong, G. S., Zhang, F., Isern, N. G., DeGregori, J., Hodges, R., and Eisenmesser, E. Z. (2009) Solution characterization of the extracellular region of CD147 and its interaction with its enzyme ligand cyclophilin A, *J Mol Biol* 391, 518-535.
167. Damsker, J. M., Bukrinsky, M. I., and Constant, S. L. (2007) Preferential chemotaxis of activated human CD4+ T cells by extracellular cyclophilin A, *J Leukoc Biol* 82, 613-618.

168. Bukrinsky, M. (2015) Extracellular cyclophilins in health and disease, *Biochim Biophys Acta* 1850, 2087-2095.
169. Yurchenko, V., Pushkarsky, T., Li, J. H., Dai, W. W., Sherry, B., and Bukrinsky, M. (2005) Regulation of CD147 cell surface expression: involvement of the proline residue in the CD147 transmembrane domain, *J Biol Chem* 280, 17013-17019.
170. Bahmed, K., Henry, C., Holliday, M., Redzic, J., Ciobanu, M., Zhang, F., Weekes, C., Sclafani, R., Degregori, J., and Eisenmesser, E. (2012) Extracellular cyclophilin-A stimulates ERK1/2 phosphorylation in a cell-dependent manner but broadly stimulates nuclear factor kappa B, *Cancer Cell Int* 12, 19.
171. Zhou, D., Mei, Q., Li, J., and He, H. (2012) Cyclophilin A and viral infections, *Biochem Biophys Res Commun* 424, 647-650.
172. Obchoei, S., Wongkhan, S., Wongkham, C., Li, M., Yao, Q., and Chen, C. (2009) Cyclophilin A: potential functions and therapeutic target for human cancer, *Med Sci Monit* 15, RA221-232.
173. Bell, R. D., Winkler, E. A., Singh, I., Sagare, A. P., Deane, R., Wu, Z., Holtzman, D. M., Betsholtz, C., Armulik, A., Sallstrom, J., Berk, B. C., and Zlokovic, B. V. (2012) Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A, *Nature* 485, 512-516.
174. Satoh, K., Nigro, P., Matoba, T., O'Dell, M. R., Cui, Z., Shi, X., Mohan, A., Yan, C., Abe, J., Illig, K. A., and Berk, B. C. (2009) Cyclophilin A enhances vascular oxidative stress and the development of angiotensin II-induced aortic aneurysms, *Nat Med* 15, 649-656.
175. Satoh, K., Matoba, T., Suzuki, J., O'Dell, M. R., Nigro, P., Cui, Z., Mohan, A., Pan, S., Li, L., Jin, Z. G., Yan, C., Abe, J., and Berk, B. C. (2008) Cyclophilin A mediates vascular remodeling by promoting inflammation and vascular smooth muscle cell proliferation, *Circulation* 117, 3088-3098.
176. Xue, Z., Yuan, W., Li, J., Zhou, H., Xu, L., Weng, J., Li, X., Zhang, X., Wang, Z., and Yan, J. (2017) Cyclophilin A mediates the ox-LDL-induced activation and apoptosis of macrophages via autophagy, *Int J Cardiol* 230, 142-148.
177. Seizer, P., Ochmann, C., Schonberger, T., Zach, S., Rose, M., Borst, O., Klingel, K., Kandolf, R., MacDonald, H. R., Nowak, R. A., Engelhardt, S., Lang, F., Gawaz, M., and May, A. E. (2011) Disrupting the EMMPRIN (CD147)-cyclophilin A interaction reduces infarct size and preserves systolic function after myocardial ischemia and reperfusion, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 1377-1386.
178. Elvers, M., Herrmann, A., Seizer, P., Munzer, P., Beck, S., Schonberger, T., Borst, O., Martin-Romero, F. J., Lang, F., May, A. E., and Gawaz, M. (2012) Intracellular cyclophilin A is an important Ca(2+) regulator in platelets and critically involved in arterial thrombus formation, *Blood* 120, 1317-1326.
179. Satoh, K., Fukumoto, Y., Sugimura, K., Miura, Y., Aoki, T., Nochioka, K., Tatebe, S., Miyamichi-Yamamoto, S., Shimizu, T., Osaki, S., Takagi, Y., Tsuburaya, R., Ito, Y., Matsumoto, Y., Nakayama, M., Takeda, M., Takahashi, J., Ito, K., Yasuda, S., and Shimokawa, H. (2013) Plasma cyclophilin A is a novel biomarker for coronary artery disease, *Circ J* 77, 447-455.
180. Ramachandran, S., Venugopal, A., Kutty, V. R., A, V., G, D., Chitrasree, V., Mullassari, A., Pratapchandran, N. S., Santosh, K. R., Pillai, M. R., and Kartha, C. C. (2014) Plasma level of cyclophilin A is increased in patients with type 2 diabetes mellitus and suggests presence of vascular disease, *Cardiovasc Diabetol* 13, 38.
181. Chang, C. S., Su, S. L., Chang, C. C., Lee, K. W., Kuo, C. L., Huang, C. S., Tseng, W. M., and Liu, C. S. (2013) Cyclophilin-A: a novel biomarker for untreated male essential hypertension, *Biomarkers* 18, 716-720.

182. Satoh, K., Fukumoto, Y., and Shimokawa, H. (2011) Rho-kinase: important new therapeutic target in cardiovascular diseases, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301, H287-296.
183. Satoh, K. (2015) Cyclophilin A in cardiovascular homeostasis and diseases, *Tohoku J Exp Med* 235, 1-15.
184. Hanouille, X., Melchior, A., Sibille, N., Parent, B., Denys, A., Wieruszeski, J. M., Horvath, D., Allain, F., Lippens, G., and Landrieu, I. (2007) Structural and functional characterization of the interaction between cyclophilin B and a heparin-derived oligosaccharide, *J Biol Chem* 282, 34148-34158.
185. Price, E. R., Jin, M., Lim, D., Pati, S., Walsh, C. T., and McKeon, F. D. (1994) Cyclophilin B trafficking through the secretory pathway is altered by binding of cyclosporin A, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3931-3935.
186. Kim, J., Choi, T. G., Ding, Y., Kim, Y., Ha, K. S., Lee, K. H., Kang, I., Ha, J., Kaufman, R. J., Lee, J., Choe, W., and Kim, S. S. (2008) Overexpressed cyclophilin B suppresses apoptosis associated with ROS and Ca²⁺ homeostasis after ER stress, *J Cell Sci* 121, 3636-3648.
187. DeBoer, J., Madson, C. J., and Belshan, M. (2016) Cyclophilin B enhances HIV-1 infection, *Virology* 489, 282-291.
188. Eisenberg, D. M., Landsberg, L., Allred, E. N., Saper, R. B., and Delbanco, T. L. (1991) Inability to demonstrate physiologic correlates of subjective improvement among patients taught the relaxation response, *J Gen Intern Med* 6, 64-70.
189. Stocki, P., Chapman, D. C., Beach, L. A., and Williams, D. B. (2014) Depletion of cyclophilins B and C leads to dysregulation of endoplasmic reticulum redox homeostasis, *J Biol Chem* 289, 23086-23096.
190. Barnes, A. M., Carter, E. M., Cabral, W. A., Weis, M., Chang, W., Makareeva, E., Leikin, S., Rotimi, C. N., Eyre, D. R., Raggio, C. L., and Marini, J. C. (2010) Lack of cyclophilin B in osteogenesis imperfecta with normal collagen folding, *N Engl J Med* 362, 521-528.
191. Rycyzyn, M. A., Reilly, S. C., O'Malley, K., and Clevenger, C. V. (2000) Role of cyclophilin B in prolactin signal transduction and nuclear retrotranslocation, *Mol Endocrinol* 14, 1175-1186.
192. Marcant, A., Denys, A., Melchior, A., Martinez, P., Deligny, A., Carpentier, M., and Allain, F. (2012) Cyclophilin B attenuates the expression of TNF-alpha in lipopolysaccharide-stimulated macrophages through the induction of B cell lymphoma-3, *J Immunol* 189, 2023-2032.
193. Jeong, K., Kim, H., Kim, K., Kim, S. J., Hahn, B. S., Jahng, G. H., Yoon, K. S., Kim, S. S., Ha, J., Kang, I., and Choe, W. (2014) Cyclophilin B is involved in p300-mediated degradation of CHOP in tumor cell adaptation to hypoxia, *Cell Death Differ* 21, 438-450.
194. Liao, D. F., Jin, Z. G., Baas, A. S., Daum, G., Gygi, S. P., Aebersold, R., and Berk, B. C. (2000) Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells, *J Biol Chem* 275, 189-196.
195. Holfeld, J., Tepekoylu, C., Kozaryn, R., Urbschat, A., Zacharowski, K., Grimm, M., and Paulus, P. (2014) Shockwave therapy differentially stimulates endothelial cells: implications on the control of inflammation via toll-Like receptor 3, *Inflammation* 37, 65-70.
196. Friedman, J., Weissman, I., Friedman, J., and Alpert, S. (1994) An analysis of the expression of cyclophilin C reveals tissue restriction and an intriguing pattern in the mouse kidney, *Am J Pathol* 144, 1247-1256.

197. Friedman, J., and Weissman, I. (1991) Two cytoplasmic candidates for immunophilin action are revealed by affinity for a new cyclophilin: one in the presence and one in the absence of CsA, *Cell* 66, 799-806.
198. Montague, J. W., Hughes, F. M., Jr., and Cidlowski, J. A. (1997) Native recombinant cyclophilins A, B, and C degrade DNA independently of peptidylprolyl cis-trans-isomerase activity. Potential roles of cyclophilins in apoptosis, *J Biol Chem* 272, 6677-6684.
199. Mi, Z., Oliver, T., Guo, H., Gao, C., and Kuo, P. C. (2007) Thrombin-cleaved COOH(-) terminal osteopontin peptide binds with cyclophilin C to CD147 in murine breast cancer cells, *Cancer Res* 67, 4088-4097.
200. Yurchenko, V., Constant, S., Eisenmesser, E., and Bukrinsky, M. (2010) Cyclophilin-CD147 interactions: a new target for anti-inflammatory therapeutics, *Clin Exp Immunol* 160, 305-317.
201. Yamaguchi, R., Hosaka, M., Torii, S., Hou, N., Saito, N., Yoshimoto, Y., Imai, H., and Takeuchi, T. (2011) Cyclophilin C-associated protein regulation of phagocytic functions via NFAT activation in macrophages, *Brain Res* 1397, 55-65.
202. Shimizu, T., Imai, H., Seki, K., Tomizawa, S., Nakamura, M., Honda, F., Kawahara, N., and Saito, N. (2005) Cyclophilin C-associated protein and cyclophilin C mRNA are upregulated in penumbral neurons and microglia after focal cerebral ischemia, *J Cereb Blood Flow Metab* 25, 325-337.
203. Gao, Y. F., Zhu, T., Mao, C. X., Liu, Z. X., Wang, Z. B., Mao, X. Y., Li, L., Yin, J. Y., Zhou, H. H., and Liu, Z. Q. (2016) PPIC, EMP3 and CHI3L1 Are Novel Prognostic Markers for High Grade Glioma, *Int J Mol Sci* 17.
204. Paiva, R. S., Ramos, C. V., Azenha, S. R., Alves, C., Basto, A. P., Graca, L., and Martins, V. C. (2021) Peptidylprolyl isomerase C (Ppic) regulates invariant Natural Killer T cell (iNKT) differentiation in mice, *Eur J Immunol*.
205. Bauer, T. M., and Murphy, E. (2020) Role of Mitochondrial Calcium and the Permeability Transition Pore in Regulating Cell Death, *Circ Res* 126, 280-293.
206. Amanakis, G., and Murphy, E. (2020) Cyclophilin D: An Integrator of Mitochondrial Function, *Front Physiol* 11, 595.
207. Tarasov, A. I., Griffiths, E. J., and Rutter, G. A. (2012) Regulation of ATP production by mitochondrial Ca(2+), *Cell Calcium* 52, 28-35.
208. Beutner, G., Alanzalon, R. E., and Porter, G. A., Jr. (2017) Cyclophilin D regulates the dynamic assembly of mitochondrial ATP synthase into synthasomes, *Sci Rep* 7, 14488.
209. Giorgio, V., Bisetto, E., Soriano, M. E., Dabbeni-Sala, F., Basso, E., Petronilli, V., Forte, M. A., Bernardi, P., and Lippe, G. (2009) Cyclophilin D modulates mitochondrial F0F1-ATP synthase by interacting with the lateral stalk of the complex, *J Biol Chem* 284, 33982-33988.
210. Tavecchio, M., Lisanti, S., Lam, A., Ghosh, J. C., Martin, N. M., O'Connell, M., Weeraratna, A. T., Kossenkov, A. V., Showe, L. C., and Altieri, D. C. (2013) Cyclophilin D extramitochondrial signaling controls cell cycle progression and chemokine-directed cell motility, *J Biol Chem* 288, 5553-5561.
211. Baines, C. P., Kaiser, R. A., Purcell, N. H., Blair, N. S., Osinska, H., Hambleton, M. A., Brunskill, E. W., Sayen, M. R., Gottlieb, R. A., Dorn, G. W., Robbins, J., and Molkentin, J. D. (2005) Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death, *Nature* 434, 658-662.
212. Bibli, S. I., Papapetropoulos, A., Iliodromitis, E. K., Daiber, A., Randriamboavonjy, V., Steven, S., Brouckaert, P., Chatzianastasiou, A., Kypreos, K. E., Hausenloy, D. J., Fleming,

- I., and Andreadou, I. (2019) Nitroglycerine limits infarct size through S-nitrosation of cyclophilin D: a novel mechanism for an old drug, *Cardiovasc Res* 115, 625-636.
213. Park, J. S., Pasupulati, R., Feldkamp, T., Roeser, N. F., and Weinberg, J. M. (2011) Cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition in kidney proximal tubules after hypoxic and ischemic injury, *Am J Physiol Renal Physiol* 301, F134-150.
214. Warne, J., Pryce, G., Hill, J. M., Shi, X., Lenneras, F., Puentes, F., Kip, M., Hilditch, L., Walker, P., Simone, M. I., Chan, A. W., Towers, G. J., Coker, A. R., Duchen, M. R., Szabadkai, G., Baker, D., and Selwood, D. L. (2016) Selective Inhibition of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Protects against Neurodegeneration in Experimental Multiple Sclerosis, *J Biol Chem* 291, 4356-4373.
215. Dubinin, M. V., Talanov, E. Y., Tenkov, K. S., Starinets, V. S., Mikheeva, I. B., Sharapov, M. G., and Belosludtsev, K. N. (2020) Duchenne muscular dystrophy is associated with the inhibition of calcium uniport in mitochondria and an increased sensitivity of the organelles to the calcium-induced permeability transition, *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1866, 165674.
216. Du, H., Guo, L., Zhang, W., Rydzewska, M., and Yan, S. (2011) Cyclophilin D deficiency improves mitochondrial function and learning/memory in aging Alzheimer disease mouse model, *Neurobiol Aging* 32, 398-406.
217. Forte, M., Gold, B. G., Marracci, G., Chaudhary, P., Basso, E., Johnsen, D., Yu, X., Fowlkes, J., Rahder, M., Stem, K., Bernardi, P., and Bourdette, D. (2007) Cyclophilin D inactivation protects axons in experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7558-7563.
218. Li, X., Fang, P., Yang, W. Y., Chan, K., Lavalley, M., Xu, K., Gao, T., Wang, H., and Yang, X. (2017) Mitochondrial ROS, uncoupled from ATP synthesis, determine endothelial activation for both physiological recruitment of patrolling cells and pathological recruitment of inflammatory cells, *Can J Physiol Pharmacol* 95, 247-252.
219. Ungvari, Z., Orosz, Z., Labinskyy, N., Rivera, A., Xiangmin, Z., Smith, K., and Csiszar, A. (2007) Increased mitochondrial H₂O₂ production promotes endothelial NF-kappaB activation in aged rat arteries, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293, H37-47.
220. Schinzel, A. C., Takeuchi, O., Huang, Z., Fisher, J. K., Zhou, Z., Rubens, J., Hetz, C., Danial, N. N., Moskowitz, M. A., and Korsmeyer, S. J. (2005) Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12005-12010.
221. Wang, X., Carlsson, Y., Basso, E., Zhu, C., Rousset, C. I., Rasola, A., Johansson, B. R., Blomgren, K., Mallard, C., Bernardi, P., Forte, M. A., and Hagberg, H. (2009) Developmental shift of cyclophilin D contribution to hypoxic-ischemic brain injury, *J Neurosci* 29, 2588-2596.
222. Ruiz-Meana, M., Inserte, J., Fernandez-Sanz, C., Hernando, V., Miro-Casas, E., Barba, I., and Garcia-Dorado, D. (2011) The role of mitochondrial permeability transition in reperfusion-induced cardiomyocyte death depends on the duration of ischemia, *Basic Res Cardiol* 106, 1259-1268.
223. Dube, H., Selwood, D., Malouitre, S., Capano, M., Simone, M. I., and Crompton, M. (2012) A mitochondrial-targeted cyclosporin A with high binding affinity for cyclophilin D yields improved cytoprotection of cardiomyocytes, *Biochem J* 441, 901-907.
224. Lim, S. Y., Hausenloy, D. J., Arjun, S., Price, A. N., Davidson, S. M., Lythgoe, M. F., and Yellon, D. M. (2011) Mitochondrial cyclophilin-D as a potential therapeutic target for post-myocardial infarction heart failure, *J Cell Mol Med* 15, 2443-2451.

225. Elrod, J. W., Wong, R., Mishra, S., Vagnozzi, R. J., Sakthivel, B., Goonasekera, S. A., Karch, J., Gabel, S., Farber, J., Force, T., Brown, J. H., Murphy, E., and Molkentin, J. D. (2010) Cyclophilin D controls mitochondrial pore-dependent Ca^{2+} exchange, metabolic flexibility, and propensity for heart failure in mice, *J Clin Invest* 120, 3680-3687.
226. Huo, D. H., Yi, L. N., and Yang, J. (2008) Interaction with Ppil3 leads to the cytoplasmic localization of Apoptin in tumor cells, *Biochem Biophys Res Commun* 372, 14-18.
227. Zhao, X., Xia, C., Wang, X., Wang, H., Xin, M., Yu, L., and Liang, Y. (2018) Cyclophilin J PPIase Inhibitors Derived from 2,3-Quinoxaline-6 Amine Exhibit Antitumor Activity, *Front Pharmacol* 9, 126.
228. Sheng, C., Yao, C., Wang, Z., Chen, H., Zhao, Y., Xu, D., Huang, H., Huang, W., and Chen, S. (2018) Cyclophilin J limits inflammation through the blockage of ubiquitin chain sensing, *Nat Commun* 9, 4381.
229. Helmer, R. A., Martinez-Zaguilan, R., Dertien, J. S., Fulford, C., Foreman, O., Peiris, V., and Chilton, B. S. (2013) Helicase-like transcription factor (Hltf) regulates G2/M transition, Wt1/Gata4/Hif-1 α cardiac transcription networks, and collagen biogenesis, *PLoS One* 8, e80461.
230. Mark, P. J., Ward, B. K., Kumar, P., Lahooti, H., Minchin, R. F., and Ratajczak, T. (2001) Human cyclophilin 40 is a heat shock protein that exhibits altered intracellular localization following heat shock, *Cell Stress Chaperones* 6, 59-70.
231. Pratt, W. B., Galigniana, M. D., Harrell, J. M., and DeFranco, D. B. (2004) Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement, *Cell Signal* 16, 857-872.
232. Pearson, J. D., Mohammed, Z., Bacani, J. T., Lai, R., and Ingham, R. J. (2012) The heat shock protein-90 co-chaperone, Cyclophilin 40, promotes ALK-positive, anaplastic large cell lymphoma viability and its expression is regulated by the NPM-ALK oncoprotein, *BMC Cancer* 12, 229.
233. Baker, J. D., Shelton, L. B., Zheng, D., Favretto, F., Nordhues, B. A., Darling, A., Sullivan, L. E., Sun, Z., Solanki, P. K., Martin, M. D., Suntharalingam, A., Sabbagh, J. J., Becker, S., Mandelkow, E., Uversky, V. N., Zweckstetter, M., Dickey, C. A., Koren, J., 3rd, and Blair, L. J. (2017) Human cyclophilin 40 unravels neurotoxic amyloids, *PLoS Biol* 15, e2001336.
234. Gallay, P. A. (2009) Cyclophilin inhibitors, *Clin Liver Dis* 13, 403-417.
235. Wu, Q., and Kuca, K. (2019) Metabolic Pathway of Cyclosporine A and Its Correlation with Nephrotoxicity, *Curr Drug Metab* 20, 84-90.
236. Debbab, A., Aly, A. H., Lin, W. H., and Proksch, P. (2010) Bioactive compounds from marine bacteria and fungi, *Microb Biotechnol* 3, 544-563.
237. Al-Dhabi, N. A., Mohammed Ghilan, A. K., Esmail, G. A., Valan Arasu, M., Duraipandian, V., and Ponmurugan, K. (2019) Bioactivity assessment of the Saudi Arabian Marine Streptomyces sp. Al-Dhabi-90, metabolic profiling and its in vitro inhibitory property against multidrug resistant and extended-spectrum beta-lactamase clinical bacterial pathogens, *J Infect Public Health* 12, 549-556.
238. Jimenez, P. C., Wilke, D. V., Branco, P. C., Bauermeister, A., Rezende-Teixeira, P., Gaudencio, S. P., and Costa-Lotufo, L. V. (2020) Enriching cancer pharmacology with drugs of marine origin, *Br J Pharmacol* 177, 3-27.
239. Lillsunde, K. E., Tomasic, T., Kikelj, D., and Tammela, P. (2017) Marine alkaloid oroidin analogues with antiviral potential: A novel class of synthetic compounds targeting the cellular chaperone Hsp90, *Chem Biol Drug Des* 90, 1147-1154.

240. Pinheiro, G., Araujo Filho, I., Araujo Neto, I., Rego, A. C. M., Azevedo, E. P., Pinheiro, F. I., and Lima Filho, A. A. S. (2018) Nature as a source of drugs for ophthalmology, *Arq Bras Oftalmol* 81, 443-454.

241. Horton, T., and Kroh, A., and Ah Yong, S., and Bailly, N., and Boyko, C. B., and Brandão, S. N., and Gofas, S., and Hooper, J. N. A., and Hernandez, F., and Holovachov, O., and Mees, J., and Molodtsova, T. N., and Paulay, G., and Decock, W., and Dekeyser, S., and Poffyn, G., and Vandepitte, L., and Vanhoorne, B., and Adlard, R., and Agatha, S., and Ahn, K. J., and Akkari, N., and Alvarez, B., and Anderberg, A., and Anderson, G., and Angel, M. V., and Antic, D., and Arango, C., and Artois, T., and Atkinson, S., and Auffenberg, K., and Baldwin, B. G., and Bank, R., and Barber, A., and Barbosa, J. P., and Bartsch, I., and Bellan-Santini, D., and Bergh, N., and Bernot, J., and Berta, A., and Bezerra, T. N., and Bieler, R., and Blanco, S., and Blasco-Costa, I., and Blazewicz, M., and Bock, P., and Bonifacino de León, M., and Böttger-Schnack, R., and Bouchet, P., and Boury-Esnault, N., and Boxshall, G., and Bray, R., and Bruce, N. L., and Cairns, S., and Calvo Casas, J., and Carballo, J. L., and Cárdenas, P., and Carstens, E., and Chan, B. K., and Chan, T. Y., and Cheng, L., and Christenhusz, M., and Churchill, M., and Coleman, C. O., and Collins, A. G., and Collins, G. E., and Corbari, L., and Cordeiro, R., and Cornils, A., and Coste, M., and Costello, M. J., and Crandall, K. A., and Cremonte, F., and Cribb, T., and Cutmore, S., and Dahdouh-Guebas, F., and Daly, M., and Daneliya, M., and Dauvin, J. C., and Davie, P., and De Broyer, C., and De Grave, S., and de Mazancourt, V., and de Voogd, N. J., and Decker, P., and Defaye, D., and d'Hondt, J. L., and Dippenaar, S., and Dohrmann, M., and Dolan, J., and Domning, D., and Downey, R., and Ector, L., and Eisendle, U., and Eitel, M., and Encarnação, S. C. d., and Enghoff, H., and Epler, J., and Ewers-Saucedo, C., and Faber, M., and Figueroa, D., and Finn, J., and Fišer, C., and Fordyce, E., and Foster, W., and Frank, J. H., and Fransen, C., and Freire, S., and Furuya, H., and Galea, H., and Gao, T., and Garcia-Alvarez, O., and Garcia-Jacas, N., and Garic, R., and Garnett, S., and Gasca, R., and Gaviria-Melo, S., and Gerken, S., and Gibson, D., and Gibson, R., and Gil, J., and Gittenberger, A., and Glasby, C., and Glover, A., and Gómez-Noguera, S. E., and González-Solís, D., and Gordon, D., and Gostel, M., and Grabowski, M., and Gravili, C., and Guerra-García, J. M., and Guidetti, R., and Guiry, M. D., and Gutierrez, D., and Hadfield, K. A., and Hajdu, E., and Hallermann, J., and Hayward, B. W., and Heiden, G., and Hendrycks, E., and Herbert, D., and Herrera Bachiller, A., and Ho, J. s., and Hodda, M., and Høeg, J., and Hoeksema, B., and Houart, R., and Hughes, L., and Hyžný, M., and Iniesta, L. F. M., and Iseto, T., and Ivanenko, S., and Iwataki, M., and Janssen, R., and Jarms, G., and Jaume, D., and Jazdzewski, K., and Jersabek, C. D., and Jóźwiak, P., and Kabat, A., and Kantor, Y., and Karanovic, I., and Karthick, B., and Kathirithamby, J., and Katinas, L., and Kim, Y. H., and King, R., and Kirk, P. M., and Klautau, M., and Kociolek, J. P., and Köhler, F., and Kolb, J., and Konowalik, K., and Kotov, A., and Kremenetskaia, A., and Kristensen, R. M., and Kulikovskiy, M., and Kullander, S., and Kupriyanova, E., and Lambert, G., and Lazarus, D., and Le Coze, F., and LeCroy, S., and Leduc, D., and Lefkowitz, E. J., and Lemaitre, R., and Lichter-Marck, I. H., and Lindsay, D., and Liu, Y., and Loeuille, B., and Lörz, A. N., and Lowry, J., and Ludwig, T., and Lundholm, N., and Macpherson, E., and Madin, L., and Mah, C., and Mamo, B., and Mamos, T., and Manconi, R., and Mapstone, G., and Marek, P. E., and Marshall, B., and Marshall, D. J., and Martin, P., and Mast, R., and McFadden, C., and McInnes, S. J., and Meidla, T., and Meland, K., and Melo da Silva, D. C., and Merrin, K. L., and Messing, C., and Mills, C., and Moestrup, Ø., and Mokievsky, V., and Monniot, F., and Mooi, R., and Morandini, A. C., and Moreira da Rocha, R., and Morrow, C., and Mortelmans, J., and Mortimer, J., and Musco, L., and Nesom, G., and Neubauer, T. A., and Neubert, E., and Neuhaus, B., and Ng, P., and Nguyen, A. D., and Nielsen, C., and Nishikawa, T., and

Norenburg, J., and O'Hara, T., and Opresko, D., and Osawa, M., and Osigus, H. J., and Ota, Y., and Páll-Gergely, B., and Panero, J. L., and Pasini, E., and Patterson, D., and Paxton, H., and Pelsner, P., and Peña-Santiago, R., and Perrier, V., and Petrescu, I., and Pica, D., and Picton, B., and Pilger, J. F., and Pisera, A. B., and Polhemus, D., and Poore, G. C., and Potapova, M., and Pugh, P., and Read, G., and Reich, M., and Reimer, J. D., and Reip, H., and Reuscher, M., and Reynolds, J. W., and Richling, I., and Rimet, F., and Ríos, P., and Rius, M., and Rodríguez, E., and Rogers, D. C., and Roque, N., and Rosenberg, G., and Rützler, K., and Saavedra, M., and Sabbe, K., and Saiz-Salinas, J., and Sala, S., and Santagata, S., and Santos, S., and Sar, E., and Satoh, A., and Saucède, T., and Schatz, H., and Schierwater, B., and Schilling, E., and Schmidt-Rhaesa, A., and Schneider, S., and Schönberg, C., and Schuchert, P., and Senna, A. R., and Sennikov, A., and Serejo, C., and Shaik, S., and Shamsi, S., and Sharma, J., and Shear, W. A., and Shenkar, N., and Shinn, A., and Short, M., and Sicinski, J., and Sierwald, P., and Simmons, E., and Sinniger, F., and Sivell, D., and Sket, B., and Smit, H., and Smit, N., and Smol, N., and Souza-Filho, J. F., and Spelda, J., and Sterrer, W., and Stienen, E., and Stoev, P., and Stöhr, S., and Strand, M., and Suárez-Morales, E., and Summers, M., and Suppan, L., and Susanna, A., and Suttle, C., and Swalla, B. J., and Taiti, S., and Tanaka, M., and Tandberg, A. H., and Tang, D., and Tasker, M., and Taylor, J., and Taylor, J., and Tchesunov, A., and Temereva, E., and ten Hove, H., and ter Poorten, J. J., and Thomas, J. D., and Thuesen, E. V., and Thurston, M., and Thuy, B., and Timi, J. T., and Timm, T., and Todaro, A., and Turon, X., and Uetz, P., and Urbatsch, L., and Uribe-Palomino, J., and Urtubey, E., and Utevsky, S., and Vacelet, J., and Vachard, D., and Vader, W., and Väinölä, R., and Van de Vijver, B., and van der Meij, S. E., and van Haaren, T., and van Soest, R. W., and Vanreusel, A., and Venekey, V., and Vinarski, M., and Vonk, R., and Vos, C., and Walker-Smith, G., and Walter, T. C., and Watling, L., and Wayland, M., and Wesener, T., and Wetzel, C. E., and Whipps, C., and White, K., and Wieneke, U., and Williams, D. M., and Williams, G., and Wilson, R., and Witkowski, A., and Witkowski, J., and Wyatt, N., and Wylezich, C., and Xu, K., and Zanol, J., and Zeidler, W., and Zhao, Z. (2021) World Register of Marine Species (WoRMS), WoRMS Editorial Board.

242. Baker, B. J., Appler, K. E., and Gong, X. (2021) New Microbial Biodiversity in Marine Sediments, *Ann Rev Mar Sci* 13, 161-175.

243. Xie, C. L., Xia, J. M., Wang, J. S., Lin, D. H., and Yang, X. W. (2018) Metabolomic Investigations on *Nesterenkonia flava* Revealed Significant Differences between Marine and Terrestrial Actinomycetes, *Mar Drugs* 16.

244. Rateb, M. E., and Ebel, R. (2011) Secondary metabolites of fungi from marine habitats, *Nat Prod Rep* 28, 290-344.

245. Barzkar, N., Tamadoni Jahromi, S., Poorsaheli, H. B., and Vianello, F. (2019) Metabolites from Marine Microorganisms, Micro, and Macroalgae: Immense Scope for Pharmacology, *Mar Drugs* 17.

246. Ameen, F., AlNadhari, S., and Al-Homaidan, A. A. (2021) Marine microorganisms as an untapped source of bioactive compounds, *Saudi J Biol Sci* 28, 224-231.

247. Donia, M., and Hamann, M. T. (2003) Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents, *Lancet Infect Dis* 3, 338-348.

248. Corinaldesi, C., Barone, G., Marcellini, F., Dell'Anno, A., and Danovaro, R. (2017) Marine Microbial-Derived Molecules and Their Potential Use in Cosmeceutical and Cosmetic Products, *Mar Drugs* 15.

249. Siddharth, S., and Vittal, R. R. (2018) Evaluation of Antimicrobial, Enzyme Inhibitory, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Partially Purified Volatile Metabolites of Marine *Streptomyces* sp.S2A, *Microorganisms* 6.

250. Rao, T. E., Imchen, M., and Kumavath, R. (2017) Marine Enzymes: Production and Applications for Human Health, *Adv Food Nutr Res* 80, 149-163.
251. Jensen, P. R., Mincer, T. J., Williams, P. G., and Fenical, W. (2005) Marine actinomycete diversity and natural product discovery, *Antonie Van Leeuwenhoek* 87, 43-48.
252. Feling, R. H., Buchanan, G. O., Mincer, T. J., Kauffman, C. A., Jensen, P. R., and Fenical, W. (2003) Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus salinospora, *Angew Chem Int Ed Engl* 42, 355-357.
253. Waksman, S. A., Schatz, A., and Reynolds, D. M. (2010) Production of antibiotic substances by actinomycetes, *Ann N Y Acad Sci* 1213, 112-124.
254. Chater, K. F. (2016) Recent advances in understanding Streptomyces, *F1000Res* 5, 2795.
255. Bibb, M. J. (2005) Regulation of secondary metabolism in streptomyces, *Curr Opin Microbiol* 8, 208-215.
256. Procopio, R. E., Silva, I. R., Martins, M. K., Azevedo, J. L., and Araujo, J. M. (2012) Antibiotics produced by Streptomyces, *Braz J Infect Dis* 16, 466-471.
257. Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J. P., Klenk, H. P., Clement, C., Ouhdouch, Y., and van Wezel, G. P. (2016) Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria, *Microbiol Mol Biol Rev* 80, 1-43.
258. Alvarino, R., Alonso, E., Lacret, R., Oves-Costales, D., Genilloud, O., Reyes, F., Alfonso, A., and Botana, L. M. (2019) Caniferolide A, a Macrolide from Streptomyces caniferus, Attenuates Neuroinflammation, Oxidative Stress, Amyloid-Beta, and Tau Pathology in Vitro, *Mol Pharm* 16, 1456-1466.
259. Hong, K., Gao, A. H., Xie, Q. Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H. P., Yu, H. P., Li, J., Yao, X. S., Goodfellow, M., and Ruan, J. S. (2009) Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China, *Mar Drugs* 7, 24-44.
260. Leiros, M., Alonso, E., Sanchez, J. A., Rateb, M. E., Ebel, R., Houssen, W. E., Jaspars, M., Alfonso, A., and Botana, L. M. (2014) Mitigation of ROS insults by Streptomyces secondary metabolites in primary cortical neurons, *ACS Chem Neurosci* 5, 71-80.
261. Leiros, M., Alonso, E., Rateb, M. E., Ebel, R., Jaspars, M., Alfonso, A., and Botana, L. M. (2015) The Streptomyces metabolite anhydroexfoliamycin ameliorates hallmarks of Alzheimer's disease in vitro and in vivo, *Neuroscience* 305, 26-35.
262. Singh, R., Parihar, P., Singh, M., Bajguz, A., Kumar, J., Singh, S., Singh, V. P., and Prasad, S. M. (2017) Uncovering Potential Applications of Cyanobacteria and Algal Metabolites in Biology, Agriculture and Medicine: Current Status and Future Prospects, *Front Microbiol* 8, 515.
263. Kurmayer, R., Deng, L., and Entfellner, E. (2016) Role of toxic and bioactive secondary metabolites in colonization and bloom formation by filamentous cyanobacteria Planktothrix, *Harmful Algae* 54, 69-86.
264. Tan, L. (2012) Studies in Natural Products Chemistry, Elsevier BV.
265. Demay, J., Bernard, C., Reinhardt, A., and Marie, B. (2019) Natural Products from Cyanobacteria: Focus on Beneficial Activities, *Mar Drugs* 17.
266. Mondal, A., Bose, S., Banerjee, S., Patra, J. K., Malik, J., Mandal, S. K., Kilpatrick, K. L., Das, G., Kerry, R. G., Fimognari, C., and Bishayee, A. (2020) Marine Cyanobacteria and Microalgae Metabolites-A Rich Source of Potential Anticancer Drugs, *Mar Drugs* 18.

267. Lau, N. S., Matsui, M., and Abdullah, A. A. (2015) Cyanobacteria: Photoautotrophic Microbial Factories for the Sustainable Synthesis of Industrial Products, *Biomed Res Int* 2015, 754934.
268. Taori, K., Paul, V. J., and Luesch, H. (2008) Structure and activity of largazole, a potent antiproliferative agent from the Floridian marine cyanobacterium *Symploca* sp, *J Am Chem Soc* 130, 1806-1807.
269. Wang, X., Waschke, B. C., Woolaver, R. A., Chen, Z., Zhang, G., Piscopio, A. D., Liu, X., and Wang, J. H. (2019) Histone Deacetylase Inhibition Sensitizes PD1 Blockade-Resistant B-cell Lymphomas, *Cancer Immunol Res* 7, 1318-1331.
270. Tan, L. T., and Phyo, M. Y. (2020) Marine Cyanobacteria: A Source of Lead Compounds and their Clinically-Relevant Molecular Targets, *Molecules* 25.
271. Luesch, H., Harrigan, G. G., Goetz, G., and Horgen, F. D. (2002) The cyanobacterial origin of potent anticancer agents originally isolated from sea hares, *Curr Med Chem* 9, 1791-1806.
272. Diamantis, N., and Banerji, U. (2016) Antibody-drug conjugates--an emerging class of cancer treatment, *Br J Cancer* 114, 362-367.
273. Akaiwa, M., Dugal-Tessier, J., and Mendelsohn, B. A. (2020) Antibody-Drug Conjugate Payloads; Study of Auristatin Derivatives, *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 68, 201-211.
274. Dolganyuk, V., Belova, D., Babich, O., Prosekov, A., Ivanova, S., Katserov, D., Patyukov, N., and Sukhikh, S. (2020) Microalgae: A Promising Source of Valuable Bioproducts, *Biomolecules* 10.
275. Romano, G., Costantini, M., Sansone, C., Lauritano, C., Ruocco, N., and Ianora, A. (2017) Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules, *Mar Environ Res* 128, 58-69.
276. Elagoz, A. M., Ambrosino, L., and Lauritano, C. (2020) De novo transcriptome of the diatom *Cylindrotheca closterium* identifies genes involved in the metabolism of anti-inflammatory compounds, *Sci Rep* 10, 4138.
277. Saide, A., Martinez, K. A., Ianora, A., and Lauritano, C. (2021) Unlocking the Health Potential of Microalgae as Sustainable Sources of Bioactive Compounds, *Int J Mol Sci* 22.
278. Levine, I., and Fleurence, J. (2018) *Microalgae in health and disease prevention*, Academic Press.
279. Boente-Juncal, A., Alvarez, M., Antelo, A., Rodriguez, I., Calabro, K., Vale, C., Thomas, O. P., and Botana, L. M. (2019) Structure Elucidation and Biological Evaluation of Maitotoxin-3, a Homologue of Gambierone, from *Gambierdiscus belizeanus*, *Toxins (Basel)* 11.
280. Fernandez-Araujo, A., Sanchez, J. A., Alfonso, A., Vieytes, M. R., and Botana, L. M. (2015) Different toxic effects of YTX in tumor K-562 and lymphoblastoid cell lines, *Front Pharmacol* 6, 124.
281. Tobio, A., Alfonso, A., Madera-Salcedo, I., Botana, L. M., and Blank, U. (2016) Yessotoxin, a Marine Toxin, Exhibits Anti-Allergic and Anti-Tumoural Activities Inhibiting Melanoma Tumour Growth in a Preclinical Model, *PLoS One* 11, e0167572.
282. Kohane, D. S., Lu, N. T., Gokgol-Kline, A. C., Shubina, M., Kuang, Y., Hall, S., Strichartz, G. R., and Berde, C. B. (2000) The local anesthetic properties and toxicity of saxitoxin homologues for rat sciatic nerve block in vivo, *Reg Anesth Pain Med* 25, 52-59.
283. Lima, L. M., Silva, B., Barbosa, G., and Barreiro, E. J. (2020) beta-lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective, *Eur J Med Chem* 208, 112829.
284. Hu, Y., and Zhu, B. (2016) Study on genetic engineering of *Acremonium chrysogenum*, the cephalosporin C producer, *Synth Syst Biotechnol* 1, 143-149.

285. Kanoh, K., Kohno, S., Asari, T., Harada, T., Katada, J., Muramatsu, M., Kawashima, H., Sekiya, H., and Uno, I. (1997) (–)-Phenylahistin: a new mammalian cell cycle inhibitor produced by *Aspergillus ustus*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 7, 2847-2852.
286. Natoli, M., Herzig, P., Pishali Bejestani, E., Buchi, M., Ritschard, R., Lloyd, G. K., Mohanlal, R., Tonra, J. R., Huang, L., Heinzelmann, V., Trub, M., Zippelius, A., and Kashyap, A. S. (2021) Plinabulin, a Distinct Microtubule-Targeting Chemotherapy, Promotes M1-Like Macrophage Polarization and Anti-tumor Immunity, *Front Oncol* 11, 644608.
287. Cheng, K. (2021) Learning in Cnidaria: A systematic review, *Learn Behav.*
288. Petralia, R. S., Mattson, M. P., and Yao, P. J. (2014) Aging and longevity in the simplest animals and the quest for immortality, *Ageing Res Rev* 16, 66-82.
289. Stabili, L., Parisi, M. G., Parrinello, D., and Cammarata, M. (2018) Cnidarian Interaction with Microbial Communities: From Aid to Animal's Health to Rejection Responses, *Mar Drugs* 16.
290. Kimes, N. E., Johnson, W. R., Torralba, M., Nelson, K. E., Weil, E., and Morris, P. J. (2013) The *Montastraea faveolata* microbiome: ecological and temporal influences on a Caribbean reef-building coral in decline, *Environ Microbiol* 15, 2082-2094.
291. Rocha, J., Peixe, L., Gomes, N. C., and Calado, R. (2011) Cnidarians as a source of new marine bioactive compounds--an overview of the last decade and future steps for bioprospecting, *Mar Drugs* 9, 1860-1886.
292. Ono, S., Reimer, J. D., and Tsukahara, J. (2005) Reproduction of *Zoanthus sansibaricus* in the infra-littoral zone at Taisho Lava Field, Sakurajima, Kagoshima, Japan, *Zoolog Sci* 22, 247-255.
293. Guillen, P. O., Jaramillo, K. B., Genta-Jouve, G., Sinniger, F., Rodriguez, J., and Thomas, O. P. (2017) Terrazoanthines, 2-Aminoimidazole Alkaloids from the Tropical Eastern Pacific Zoantharian *Terrazoanthus onoi*, *Org Lett* 19, 1558-1561.
294. Villar, R. M., Gil-Longo, J., Daranas, A. H., Souto, M. L., Fernandez, J. J., Peixinho, S., Barral, M. A., Santafe, G., Rodriguez, J., and Jimenez, C. (2003) Evaluation of the effects of several zoanthamine-type alkaloids on the aggregation of human platelets, *Bioorg Med Chem* 11, 2301-2306.
295. Behenna, D. C., Stockdill, J. L., and Stoltz, B. M. (2008) The biology and chemistry of the zoanthamine alkaloids, *Angew Chem Int Ed Engl* 47, 2365-2386.
296. D'Incalci, M., and Galmarini, C. M. (2010) A review of trabectedin (ET-743): a unique mechanism of action, *Mol Cancer Ther* 9, 2157-2163.
297. Kobayashi, H., Iwata, S., Wakamatsu, T., Hayakawa, K., Yonemoto, T., Wasa, J., Oka, H., Ueda, T., and Tanaka, S. (2020) Efficacy and safety of trabectedin for patients with unresectable and relapsed soft-tissue sarcoma in Japan: A Japanese Musculoskeletal Oncology Group study, *Cancer* 126, 1253-1263.
298. Sakai, R., Rinehart, K. L., Kishore, V., Kundu, B., Faircloth, G., Gloer, J. B., Carney, J. R., Namikoshi, M., Sun, F., Hughes, R. G., Jr., Garcia Gravalos, D., de Quesada, T. G., Wilson, G. R., and Heid, R. M. (1996) Structure--activity relationships of the didemnins, *J Med Chem* 39, 2819-2834.
299. Morande, P. E., Zanetti, S. R., Borge, M., Nannini, P., Jancic, C., Bezares, R. F., Bitsmans, A., Gonzalez, M., Rodriguez, A. L., Galmarini, C. M., Gamberale, R., and Giordano, M. (2012) The cytotoxic activity of Aplidin in chronic lymphocytic leukemia (CLL) is mediated by a direct effect on leukemic cells and an indirect effect on monocyte-derived cells, *Invest New Drugs* 30, 1830-1840.

300. Borjan, B., Steiner, N., Karbon, S., Kern, J., Francesch, A., Hermann, M., Willenbacher, W., Gunsilius, E., and Untergasser, G. (2015) The Aplidin analogs PM01215 and PM02781 inhibit angiogenesis in vitro and in vivo, *BMC Cancer* 15, 738.

301. Gomes, N. G. M., Valentao, P., Andrade, P. B., and Pereira, R. B. (2020) Plitidepsin to treat multiple myeloma, *Drugs Today (Barc)* 56, 337-347.

302. Varona, J. F., Landete, P., Lopez-Martin, J. A., Estrada, V., Paredes, R., Guisado-Vasco, P., de Orueta, L. F., Torralba, M., Fortun, J., Vates, R., Barberan, J., Clotet, B., Ancochea, J., Carnevali, D., Cabello, N., Porras, L., Gijon, P., Monereo, A., Abad, D., Zuniga, S., Sola, I., Rodon, J., Izquierdo-Useros, N., Fudio, S., Pontes, M. J., de Rivas, B., Giron de Velasco, P., Sopesen, B., Nieto, A., Gomez, J., Aviles, P., Lubomirov, R., White, K. M., Rosales, R., Yildiz, S., Reuschl, A. K., Thorne, L. G., Jolly, C., Towers, G. J., Zuliani-Alvarez, L., Bouhaddou, M., Obernier, K., Enjuanes, L., Fernandez-Sousa, J. M., Plitidepsin, C. S. G., Krogan, N. J., Jimeno, J. M., and Garcia-Sastre, A. (2021) Plitidepsin has a positive therapeutic index in adult patients with COVID-19 requiring hospitalization, *medRxiv*.

303. Mehbub, M. F., Lei, J., Franco, C., and Zhang, W. (2014) Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: trends and opportunities for discovery of bioactives, *Mar Drugs* 12, 4539-4577.

304. Essack, M., Bajic, V. B., and Archer, J. A. (2011) Recently confirmed apoptosis-inducing lead compounds isolated from marine sponge of potential relevance in cancer treatment, *Mar Drugs* 9, 1580-1606.

305. Thomas, T. R., Kavlekar, D. P., and LokaBharathi, P. A. (2010) Marine drugs from sponge-microbe association--a review, *Mar Drugs* 8, 1417-1468.

306. Cragg, G. M., Newman, D. J., and Weiss, R. B. (1997) Coral reefs, forests, and thermal vents: the worldwide exploration of nature for novel antitumor agents, *Semin Oncol* 24, 156-163.

307. Khalifa, S. A. M., Elias, N., Farag, M. A., Chen, L., Saeed, A., Hegazy, M. F., Moustafa, M. S., Abd El-Wahed, A., Al-Mousawi, S. M., Musharraf, S. G., Chang, F. R., Iwasaki, A., Suenaga, K., Alajlani, M., Goransson, U., and El-Seedi, H. R. (2019) Marine Natural Products: A Source of Novel Anticancer Drugs, *Mar Drugs* 17.

308. Anjum, K., Abbas, S. Q., Shah, S. A., Akhter, N., Batool, S., and Hassan, S. S. (2016) Marine Sponges as a Drug Treasure, *Biomol Ther (Seoul)* 24, 347-362.

309. Sagar, S., Kaur, M., and Minneman, K. P. (2010) Antiviral lead compounds from marine sponges, *Mar Drugs* 8, 2619-2638.

310. Fuerst, J. A. (2014) Diversity and biotechnological potential of microorganisms associated with marine sponges, *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 7331-7347.

311. Proksch, P., Edrada, R. A., and Ebel, R. (2002) Drugs from the seas - current status and microbiological implications, *Appl Microbiol Biotechnol* 59, 125-134.

312. Mayol, L., Piccialli, V. and Sica D. (1985) Gracilin A, an unique nor-diterpene metabolite from the marine sponge *Spongionella gracilis* *Tetrahedron Letters* 26, 4.

313. Potts, B. C., Faulkner, D. J., and Jacobs, R. S. (1992) Phospholipase A2 inhibitors from marine organisms, *J Nat Prod* 55, 1701-1717.

314. Rateb, M. E., Houssen, W. E., Schumacher, M., Harrison, W. T., Diederich, M., Ebel, R., and Jaspars, M. (2009) Bioactive diterpene derivatives from the marine sponge *Spongionella* sp, *J Nat Prod* 72, 1471-1476.

315. Leiros, M., Sanchez, J. A., Alonso, E., Rateb, M. E., Houssen, W. E., Ebel, R., Jaspars, M., Alfonso, A., and Botana, L. M. (2014) *Spongionella* secondary metabolites protect mitochondrial function in cortical neurons against oxidative stress, *Mar Drugs* 12, 700-718.

316. Leiros, M., Alonso, E., Rateb, M. E., Houssen, W. E., Ebel, R., Jaspars, M., Alfonso, A., and Botana, L. M. (2015) Gracilins: Spongionella-derived promising compounds for Alzheimer disease, *Neuropharmacology* 93, 285-293.
317. Sanchez, J. A., Alfonso, A., Leiros, M., Alonso, E., Rateb, M. E., Jaspars, M., Houssen, W. E., Ebel, R., Tabudravu, J., and Botana, L. M. (2016) Identification of Spongionella compounds as cyclosporine A mimics, *Pharmacol Res* 107, 407-414.
318. Sanchez, J. A., Alfonso, A., Rodriguez, I., Alonso, E., Cifuentes, J. M., Bermudez, R., Rateb, M. E., Jaspars, M., Houssen, W. E., Ebel, R., Tabudravu, J., and Botana, L. M. (2016) Spongionella Secondary Metabolites, Promising Modulators of Immune Response through CD147 Receptor Modulation, *Front Immunol* 7, 452.
319. Abbasov, M. E., Alvarino, R., Chaheine, C. M., Alonso, E., Sanchez, J. A., Conner, M. L., Alfonso, A., Jaspars, M., Botana, L. M., and Romo, D. (2019) Simplified immunosuppressive and neuroprotective agents based on gracilin A, *Nat Chem* 11, 342-350.
320. Pichon, M. (2007) Scleractinia of New Caledonia: Check list of reef dwelling species. In *COMPENDIUM OF MARINE SPECIES FROM NEW CALEDONIA* (Claude E., P. B. a. R. d. F., Ed.) 2 ed., IRD, New Caledonia.
321. Snelgrove, P. V. (2016) An Ocean of Discovery: Biodiversity Beyond the Census of Marine Life, *Planta Med* 82, 790-799.
322. Kim, H.-R. a. S., Chung-Ja. (2010) A New Species of the Genus Narrabeena (Demospongiae: Dictyoceratida: Thorectidae) from Korea, *Animal Systematics, Evolution and Diversity* 26, 4.
323. Penez, N., Culioli, G., Perez, T., Briand, J. F., Thomas, O. P., and Blache, Y. (2011) Antifouling properties of simple indole and purine alkaloids from the Mediterranean gorgonian *Paramuricea clavata*, *J Nat Prod* 74, 2304-2308.
324. Olsen, E. K., Hansen, E., L. W. K. M., Isaksson, J., Sepcic, K., Cergolj, M., Svenson, J., and Andersen, J. H. (2016) Marine AChE inhibitors isolated from *Geodia barretti*: natural compounds and their synthetic analogs, *Org Biomol Chem* 14, 1629-1640.
325. AlTarabeen, M., Hassan Aly, A., Perez Hemphill, C. F., Rasheed, M., Wray, V., and Proksch, P. (2015) New nitrogenous compounds from a Red Sea sponge from the Gulf of Aqaba, *Z Naturforsch C J Biosci* 70, 75-78.
326. Planes, S., Allemand, D., Agostini, S., Banaigs, B., Boissin, E., Boss, E., Bourdin, G., Bowler, C., Douville, E., Flores, J. M., Forcioli, D., Furla, P., Galand, P. E., Ghiglione, J. F., Gilson, E., Lombard, F., Moulin, C., Pesant, S., Poulain, J., Reynaud, S., Romac, S., Sullivan, M. B., Sunagawa, S., Thomas, O. P., Trouble, R., de Vargas, C., Vega Thurber, R., Voolstra, C. R., Wincker, P., Zoccola, D., and Tara Pacific, C. (2019) The Tara Pacific expedition-A pan-ecosystemic approach of the "-omics" complexity of coral reef holobionts across the Pacific Ocean, *PLoS Biol* 17, e3000483.
327. Lindel, T. (2017) Chemistry and Biology of the Pyrrole-Imidazole Alkaloids, *Alkaloids Chem Biol* 77, 117-219.
328. Al-Mourabit, A., Zancanella, M. A., Tilvi, S., and Romo, D. (2011) Biosynthesis, asymmetric synthesis, and pharmacology, including cellular targets, of the pyrrole-2-aminoimidazole marine alkaloids, *Nat Prod Rep* 28, 1229-1260.
329. Cipres, A., O'Malley, D. P., Li, K., Finlay, D., Baran, P. S., and Vuori, K. (2010) Scepterin, a marine natural compound, inhibits cell motility in a variety of cancer cell lines, *ACS Chem Biol* 5, 195-202.
330. Scala, F., Fattorusso, E., Menna, M., Taglialatela-Scafati, O., Tierney, M., Kaiser, M., and Tasdemir, D. (2010) Bromopyrrole alkaloids as lead compounds against protozoan parasites, *Mar Drugs* 8, 2162-2174.

331. Hamed, A. N. E., Schmitz, R., Bergermann, A., Totzke, F., Kubbutat, M., Muller, W. E. G., Youssef, D. T. A., Bishr, M. M., Kamel, M. S., Edrada-Ebel, R., Watjen, W., and Proksch, P. (2018) Bioactive pyrrole alkaloids isolated from the Red Sea: marine sponge *Stylissa carteri*, *Z Naturforsch C J Biosci* 73, 199-210.
332. de Souza, R., Freire, V. F., Gubiani, J. R., Ferreira, R. O., Trivella, D. B. B., Moraes, F. C., Paradas, W. C., Salgado, L. T., Pereira, R. C., Amado Filho, G. M., Ferreira, A. G., Williams, D. E., Andersen, R. J., Molinski, T. F., and Berlinck, R. G. S. (2018) Bromopyrrole Alkaloid Inhibitors of the Proteasome Isolated from a Dictyonella sp. Marine Sponge Collected at the Amazon River Mouth, *J Nat Prod* 81, 2296-2300.
333. Sun, Y., Ai, X., Hou, J., Ye, X., Liu, R., Shen, S., Li, Z., and Lu, S. (2017) Integrated discovery of FOXO1-DNA stabilizers from marine natural products to restore chemosensitivity to anti-EGFR-based therapy for metastatic lung cancer, *Mol Biosyst* 13, 330-337.
334. Kobayashi, J., Ohizumi, Y., Nakamura, H., and Hirata, Y. (1986) A novel antagonist of serotonergic receptors, hymenidin, isolated from the Okinawan marine sponge *Hymeniacidon* sp., *Experientia* 42, 1176-1177.
335. Zidar, N., Zula, A., Tomasic, T., Rogers, M., Kirby, R. W., Tytgat, J., Peigneur, S., Kikelj, D., Ilas, J., and Masic, L. P. (2017) Clathrocin, hymenidin and oroidin, and their synthetic analogues as inhibitors of the voltage-gated potassium channels, *Eur J Med Chem* 139, 232-241.
336. Dyson, L., Wright, A. D., Young, K. A., Sakoff, J. A., and McCluskey, A. (2014) Synthesis and anticancer activity of focused compound libraries from the natural product lead, oroidin, *Bioorg Med Chem* 22, 1690-1699.
337. Zidar, N., Montalvao, S., Hodnik, Z., Nawrot, D. A., Zula, A., Ilas, J., Kikelj, D., Tammela, P., and Masic, L. P. (2014) Antimicrobial activity of the marine alkaloids, clathrocin and oroidin, and their synthetic analogues, *Mar Drugs* 12, 940-963.
338. Vistica, D. T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A., and Boyd, M. R. (1991) Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production, *Cancer Res* 51, 2515-2520.
339. Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H., and Schubert, D. (1997) Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction, *J Neurochem* 69, 581-593.
340. Lemasters, J. J., and Ramshesh, V. K. (2007) Imaging of mitochondrial polarization and depolarization with cationic fluorophores, *Methods Cell Biol* 80, 283-295.
341. Halliwell, B., and Whiteman, M. (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?, *Br J Pharmacol* 142, 231-255.
342. Jing, Q., Hu, X., Ma, Y., Mu, J., Liu, W., Xu, F., Li, Z., Bai, J., Hua, H., and Li, D. (2019) Marine-Derived Natural Lead Compound Disulfide-Linked Dimer Psammaplin A: Biological Activity and Structural Modification, *Mar Drugs* 17.
343. Zhou, Z. L., Yang, Y. X., Ding, J., Li, Y. C., and Miao, Z. H. (2012) Triptolide: structural modifications, structure-activity relationships, bioactivities, clinical development and mechanisms, *Nat Prod Rep* 29, 457-475.
344. Zhang, A., Sun, H., and Wang, X. (2013) Recent advances in natural products from plants for treatment of liver diseases, *Eur J Med Chem* 63, 570-577.
345. Ziebell, J. M., Adelson, P. D., and Lifshitz, J. (2015) Microglia: dismantling and rebuilding circuits after acute neurological injury, *Metab Brain Dis* 30, 393-400.
346. Glezer, I., Simard, A. R., and Rivest, S. (2007) Neuroprotective role of the innate immune system by microglia, *Neuroscience* 147, 867-883.

347. Angelova, P. R., and Abramov, A. Y. (2018) Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration, *FEBS Lett* 592, 692-702.
348. Bao, Y., Meng, X., Liu, F., Wang, F., Yang, J., Wang, H., and Xie, G. (2018) Protective effects of osthole against inflammation induced by lipopolysaccharide in BV2 cells, *Mol Med Rep* 17, 4561-4566.
349. Murakami, A., and Ohigashi, H. (2007) Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals, *Int J Cancer* 121, 2357-2363.
350. Hsu, Y. M., Chang, F. R., Lo, I. W., Lai, K. H., El-Shazly, M., Wu, T. Y., Du, Y. C., Hwang, T. L., Cheng, Y. B., and Wu, Y. C. (2016) Zoanthamine-Type Alkaloids from the Zoanthid *Zoanthus kuroshio* Collected in Taiwan and Their Effects on Inflammation, *J Nat Prod* 79, 2674-2680.
351. Yan, A., Liu, Z., Song, L., Wang, X., Zhang, Y., Wu, N., Lin, J., Liu, Y., and Liu, Z. (2018) Idebenone Alleviates Neuroinflammation and Modulates Microglial Polarization in LPS-Stimulated BV2 Cells and MPTP-Induced Parkinson's Disease Mice, *Front Cell Neurosci* 12, 529.
352. Markoutsas, E., and Xu, P. (2017) Redox Potential-Sensitive N-Acetyl Cysteine-Prodrug Nanoparticles Inhibit the Activation of Microglia and Improve Neuronal Survival, *Mol Pharm* 14, 1591-1600.
353. Perluigi, M., Tramutola, A., Pagnotta, S., Barone, E., and Butterfield, D. A. (2020) The BACH1/Nrf2 Axis in Brain in Down Syndrome and Transition to Alzheimer Disease-Like Neuropathology and Dementia, *Antioxidants (Basel)* 9.
354. Rateb, M. E., Houssen, W. E., Arnold, M., Abdelrahman, M. H., Deng, H., Harrison, W. T., Okoro, C. K., Asenjo, J. A., Andrews, B. A., Ferguson, G., Bull, A. T., Goodfellow, M., Ebel, R., and Jaspars, M. (2011) Chaxamycins A-D, bioactive ansamycins from a hyper-arid desert *Streptomyces* sp., *J Nat Prod* 74, 1491-1499.
355. Rateb, M. E., Houssen, W. E., Harrison, W. T., Deng, H., Okoro, C. K., Asenjo, J. A., Andrews, B. A., Bull, A. T., Goodfellow, M., Ebel, R., and Jaspars, M. (2011) Diverse metabolic profiles of a *Streptomyces* strain isolated from a hyper-arid environment, *J Nat Prod* 74, 1965-1971.
356. Qi, F., Sun, J. H., Yan, J. Q., Li, C. M., and Lv, X. C. (2018) Anti-inflammatory effects of isorhamnetin on LPS-stimulated human gingival fibroblasts by activating Nrf2 signaling pathway, *Microb Pathog* 120, 37-41.
357. Iizumi, T., Takahashi, S., Mashima, K., Minami, K., Izawa, Y., Abe, T., Hishiki, T., Suematsu, M., Kajimura, M., and Suzuki, N. (2016) A possible role of microglia-derived nitric oxide by lipopolysaccharide in activation of astroglial pentose-phosphate pathway via the Keap1/Nrf2 system, *J Neuroinflammation* 13, 99.
358. Li, M., Dai, F. R., Du, X. P., Yang, Q. D., and Chen, Y. (2012) Neuroprotection by silencing iNOS expression in a 6-OHDA model of Parkinson's disease, *J Mol Neurosci* 48, 225-233.
359. Olson, J. K., and Miller, S. D. (2004) Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs, *J Immunol* 173, 3916-3924.
360. Shabab, T., Khanabdali, R., Moghadamtousi, S. Z., Kadir, H. A., and Mohan, G. (2017) Neuroinflammation pathways: a general review, *Int J Neurosci* 127, 624-633.
361. Perry, V. H., Nicoll, J. A., and Holmes, C. (2010) Microglia in neurodegenerative disease, *Nat Rev Neurol* 6, 193-201.
362. Yang, J., Ding, S., Huang, W., Hu, J., Huang, S., Zhang, Y., and Zhuge, Q. (2016) Interleukin-4 Ameliorates the Functional Recovery of Intracerebral Hemorrhage Through the Alternative Activation of Microglia/Macrophage, *Front Neurosci* 10, 61.

363. Zhang, J., Zheng, Y., Luo, Y., Du, Y., Zhang, X., and Fu, J. (2019) Curcumin inhibits LPS-induced neuroinflammation by promoting microglial M2 polarization via TREM2/ TLR4/ NF-kappaB pathways in BV2 cells, *Mol Immunol* 116, 29-37.
364. Matsumoto, J., Dohgu, S., Takata, F., Machida, T., Bolukbasi Hatip, F. F., Hatip-Al-Khatib, I., Yamauchi, A., and Kataoka, Y. (2018) TNF-alpha-sensitive brain pericytes activate microglia by releasing IL-6 through cooperation between IkappaB-NFkappaB and JAK-STAT3 pathways, *Brain Res* 1692, 34-44.
365. Rojo, A. I., McBean, G., Cindric, M., Egea, J., Lopez, M. G., Rada, P., Zarkovic, N., and Cuadrado, A. (2014) Redox control of microglial function: molecular mechanisms and functional significance, *Antioxid Redox Signal* 21, 1766-1801.
366. Fernandez-Panchon, M. S., Villano, D., Troncoso, A. M., and Garcia-Parrilla, M. C. (2008) Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence, *Crit Rev Food Sci Nutr* 48, 649-671.
367. Yang, L. X., Chen, F. Y., Yu, H. L., Liu, P. Y., Bao, X. Y., Xia, S. N., Gu, Y., Xu, Y., and Cao, X. (2020) Poncirin suppresses lipopolysaccharide (LPS)-induced microglial inflammation and ameliorates brain ischemic injury in experimental stroke in mice, *Ann Transl Med* 8, 1344.
368. Scip, A., Tozzi, A., Abaza, A., Cardinetti, D., Colombo, I., Calabresi, P., Salmona, M., Welker, E., and Borsello, T. (2014) c-Jun N-terminal kinase has a key role in Alzheimer disease synaptic dysfunction in vivo, *Cell Death Dis* 5, e1019.
369. Bozic, I., Savic, D., Laketa, D., Bjelobaba, I., Milenkovic, I., Pekovic, S., Nedeljkovic, N., and Lavrnja, I. (2015) Benfotiamine attenuates inflammatory response in LPS stimulated BV-2 microglia, *PLoS One* 10, e0118372.
370. Yao, Y., and Fu, K. Y. (2020) Serum-deprivation leads to activation-like changes in primary microglia and BV-2 cells but not astrocytes, *Biomed Rep* 13, 51.
371. De Caris, M. G., Grieco, M., Maggi, E., Francioso, A., Armeli, F., Mosca, L., Pinto, A., D'Erme, M., Mancini, P., and Businaro, R. (2020) Blueberry Counteracts BV-2 Microglia Morphological and Functional Switch after LPS Challenge, *Nutrients* 12.
372. Ma, J., Cao, B., Chen, X., Xu, M., Bi, X., Guan, P., Jiang, Y., Xu, J., Han, L., and Huang, X. (2018) Violacin A, a new chromanone produced by *Streptomyces violaceoruber* and its anti-inflammatory activity, *Bioorg Med Chem Lett* 28, 947-951.
373. Sanchez, J. A., Alfonso, A., Leiros, M., Alonso, E., Rateb, M. E., Jaspars, M., Houssen, W. E., Ebel, R., and Botana, L. M. (2015) Spongionella Secondary Metabolites Regulate Store Operated Calcium Entry Modulating Mitochondrial Functioning in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells, *Cell Physiol Biochem* 37, 779-792.
374. Dawar, F. U., Wu, J., Zhao, L., Khattak, M. N., Mei, J., and Lin, L. (2017) Updates in understanding the role of cyclophilin A in leukocyte chemotaxis, *J Leukoc Biol* 101, 823-826.
375. Chrissobolis, S., Miller, A. A., Drummond, G. R., Kemp-Harper, B. K., and Sobey, C. G. (2011) Oxidative stress and endothelial dysfunction in cerebrovascular disease, *Front Biosci* 16, 1733-1745.
376. Shah, S. A., Khan, M., Jo, M. H., Jo, M. G., Amin, F. U., and Kim, M. O. (2017) Melatonin Stimulates the SIRT1/Nrf2 Signaling Pathway Counteracting Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Oxidative Stress to Rescue Postnatal Rat Brain, *CNS Neurosci Ther* 23, 33-44.
377. Lazaro, I., Lopez-Sanz, L., Bernal, S., Oguiza, A., Recio, C., Melgar, A., Jimenez-Castilla, L., Egido, J., Madrigal-Matute, J., and Gomez-Guerrero, C. (2018) Nrf2 Activation Provides Atheroprotection in Diabetic Mice Through Concerted Upregulation of Antioxidant, Anti-inflammatory, and Autophagy Mechanisms, *Front Pharmacol* 9, 819.

378. Subhramanyam, C. S., Wang, C., Hu, Q., and Dheen, S. T. (2019) Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases, *Semin Cell Dev Biol* 94, 112-120.
379. Qin, X., Li, X., Liu, C., and Chen, Z. (2017) A novel mechanism of pre-transplant insulin resistance contributing to post-transplant complications: Cyclosporin A-induced O-GlcNAcylation, *Biochem Biophys Res Commun* 492, 172-177.
380. Abd-Allah, H. F., and Abou-Zeid, N. R. (2017) Role of alpha-lipoic acid in ameliorating Cyclosporine A-induced pancreatic injury in albino rats: A structural, ultrastructural, and morphometric study, *Ultrastruct Pathol* 41, 196-208.
381. Richards, F. M., Milner, J., and Metcalfe, S. (1992) Inhibition of the serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A in lymphocytes: effect on mRNA levels for interleukin-2, IL-2R alpha, krox-24, p53, hsc70 and cyclophilin, *Immunology* 76, 642-647.
382. Chapman, D. C., Stocki, P., and Williams, D. B. (2015) Cyclophilin C Participates in the US2-Mediated Degradation of Major Histocompatibility Complex Class I Molecules, *PLoS One* 10, e0145458.
383. Otsuka, M., Terada, Y., Yang, T., Nonoguchi, H., Tomita, K., and Marumo, F. (1994) Localization of cyclophilin A and cyclophilin C mRNA in murine kidney using RT-PCR, *Kidney Int* 45, 1340-1345.
384. Ho, S., Clipstone, N., Timmermann, L., Northrop, J., Graef, I., Fiorentino, D., Nourse, J., and Crabtree, G. R. (1996) The mechanism of action of cyclosporin A and FK506, *Clin Immunol Immunopathol* 80, S40-45.
385. Arora, K., Gwinn, W. M., Bower, M. A., Watson, A., Okwumabua, I., MacDonald, H. R., Bukrinsky, M. I., and Constant, S. L. (2005) Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses, *J Immunol* 175, 517-522.
386. Hahn, J. N., Kaushik, D. K., and Yong, V. W. (2015) The role of EMMPRIN in T cell biology and immunological diseases, *J Leukoc Biol* 98, 33-48.
387. Damsker, J. M., Okwumabua, I., Pushkarsky, T., Arora, K., Bukrinsky, M. I., and Constant, S. L. (2009) Targeting the chemotactic function of CD147 reduces collagen-induced arthritis, *Immunology* 126, 55-62.
388. Alfonso, A., Bayon, J., Gegunde, S., Alonso, E., Alvarino, R., Santas-Alvarez, M., Testa-Fernandez, A., Rios-Vazquez, R., Gonzalez-Juanatey, C., and Botana, L. M. (2019) High Serum Cyclophilin C levels as a risk factor marker for Coronary Artery Disease, *Sci Rep* 9, 10576.
389. Bayon, J., Alfonso, A., Gegunde, S., Alonso, E., Alvarino, R., Santas-Alvarez, M., Testa-Fernandez, A., Rios-Vazquez, R., Botana, L., and Gonzalez-Juanatey, C. (2020) Cyclophilins in Ischemic Heart Disease: Differences Between Acute and Chronic Coronary Artery Disease Patients, *Cardiol Res* 11, 319-327.
390. Hoffmann, H., and Schiene-Fischer, C. (2014) Functional aspects of extracellular cyclophilins, *Biol Chem* 395, 721-735.
391. Foks, A. C., and Bot, I. (2017) Preface: Pathology and Pharmacology of Atherosclerosis, *Eur J Pharmacol* 816, 1-2.
392. Cung, T. T., Morel, O., Cayla, G., Rioufol, G., Garcia-Dorado, D., Angoulvant, D., Bonnefoy-Cudraz, E., Guerin, P., Elbaz, M., Delarche, N., Coste, P., Vanzetto, G., Metge, M., Aupetit, J. F., Jouve, B., Motreff, P., Tron, C., Labeque, J. N., Steg, P. G., Cottin, Y., Range, G., Clerc, J., Claeys, M. J., Coussement, P., Prunier, F., Moulin, F., Roth, O., Belle, L., Dubois, P., Barragan, P., Gilard, M., Piot, C., Colin, P., De Poli, F., Morice, M. C., Ider, O., Dubois-Rande, J. L., Untersee, T., Le Breton, H., Beard, T., Blanchard, D., Grollier, G., Malquarti, V., Staat, P., Sudre, A., Elmer, E., Hansson, M. J., Bergerot, C., Boussaha, I., Jossan, C.,

Derumeaux, G., Mewton, N., and Ovize, M. (2015) Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction, *N Engl J Med* 373, 1021-1031.

393. Nakayama, H., Chen, X., Baines, C. P., Klevitsky, R., Zhang, X., Zhang, H., Jaleel, N., Chua, B. H., Hewett, T. E., Robbins, J., Houser, S. R., and Molkentin, J. D. (2007) Ca²⁺- and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure, *J Clin Invest* 117, 2431-2444.

394. Halestrap, A. P., and Richardson, A. P. (2015) The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury, *J Mol Cell Cardiol* 78, 129-141.

395. Javadov, S., Jang, S., Parodi-Rullan, R., Khuchua, Z., and Kuznetsov, A. V. (2017) Mitochondrial permeability transition in cardiac ischemia-reperfusion: whether cyclophilin D is a viable target for cardioprotection?, *Cell Mol Life Sci* 74, 2795-2813.

396. Yee, C., Main, N. M., Terry, A., Stevanovski, I., Maczurek, A., Morgan, A. J., Calabro, S., Potter, A. J., Iemma, T. L., Bowen, D. G., Ahlenstiel, G., Warner, F. J., McCaughan, G. W., McLennan, S. V., and Shackel, N. A. (2019) CD147 mediates intrahepatic leukocyte aggregation and determines the extent of liver injury, *PLoS One* 14, e0215557.

